

Blanca Martínez Soriano

Efecto de la melatonina como fármaco antioxidante para revertir la esteatosis hepática: modelo experimental

Departamento
Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Director/es
Güemes Sánchez, Antonio Tomás

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones



Tesis Doctoral

EFECTO DE LA MELATONINA COMO FÁRMACO ANTIOXIDANTE PARA REVERTIR LA ESTEATOSIS HEPÁTICA: MODELO EXPERIMENTAL

Autor

Blanca Martínez Soriano

Director/es

Güemes Sánchez, Antonio Tomás

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Cirugía, Ginecología y Obstetricia

2017

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA, GINECOLOGÍA Y
OBSTETRICIA



TESIS DOCTORAL

**EFEECTO DE LA MELATONINA COMO FÁRMACO ANTIOXIDANTE
PARA REVERTIR LA ESTEATOSIS HEPÁTICA. MODELO EXPERIMENTAL**

BLANCA MARTÍNEZ SORIANO

Zaragoza, 2017

**EFFECTO DE LA MELATONINA COMO FÁRMACO ANTIOXIDANTE
PARA REVERTIR LA ESTEATOSIS HEPÁTICA. MODELO
EXPERIMENTAL**

Blanca Martínez Soriano



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza



**Universidad
Zaragoza**

TESIS DOCTORAL

Doctoranda: Blanca Martínez Soriano

Director

Dr. D. Antonio Tomás Güemes Sánchez

Profesor Titular de la Universidad de Zaragoza

Departamento de Cirugía, Ginecología y Obstetricia

Título

Efecto de la melatonina como fármaco antioxidante para revertir la esteatosis
hepática. Modelo experimental

Palabras clave

Esteatosis hepática, NASH, NAFLD, Melatonina

Áreas del conocimiento

Anatomía patológica (020); Cirugía (090); Medicina (610)



Facultad de Medicina
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza



El Dr. D. Antonio Güemes Sánchez, profesor titular de Cirugía del Departamento de Cirugía, Ginecología Y Obstetricia de la Universidad de Zaragoza, **hace constar:**

Que la Tesis Doctoral titulada: “Efecto de la melatonina como fármaco antioxidante para revertir la esteatosis hepática. Modelo experimental”,

presentada por Dña. Blanca Martínez Soriano bajo mi dirección, reúne los requisitos adecuados para optar al título de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

En Zaragoza, a 13 de Marzo de 2017

Fdo. Dr. D. Antonio Güemes Sánchez
Director de la Tesis Doctoral

*A mi familia y mis amigos
por su cariño, enseñanza y comprensión*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que han colaborado en la realización de este proyecto, ya que sin ellas no hubiera sido posible su consecución:

Al Dr. Antonio Güemes, director de esta tesis. Por su enseñanza y su apoyo constante, en la realización de este proyecto y en el día a día en nuestra profesión.

Al Dr. Tomás Castiella, por su entrega y dedicación en este proyecto y por todos los conocimientos aportados en el campo de la anatomía patológica.

A Patricia Carrera, por su profesionalidad, su cercanía y sus enseñanzas en el estudio estadístico.

A Javier Revilla, ingeniero del grupo, por el diseño del programa informático.

A Roberto Martínez, investigador de la Facultad de Veterinaria, por su trabajo, su ayuda incondicional y sus consejos.

A Vicente Borrego, por ayudarme en el trabajo de maquetación.

A mis compañeros del Hospital Clínico Lozano Blesa que han colaborado en las intervenciones quirúrgicas, por su esfuerzo, su entusiasmo y su apoyo.

A todos los compañeros de la Facultad de Veterinaria que se han encargado del cuidado de los animales.

A mi niña Elena, por todo el tiempo que he dejado de dedicarle. A Guille, el motor de mi vida, por su apoyo incondicional, su alegría y por estar siempre a mi lado. A mis padres por que sin ellos no habría sido posible este trabajo.

ÍNDICE

1. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA	1
2. OBJETIVOS	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
3.1. ESTEATOSIS HEPÁTICA	4
3.1.1. Etiología	5
3.1.2. Fisiopatogenia	8
3.1.3. Epidemiología	21
3.1.4. Evolución del hígado graso	25
3.1.5. Métodos de diagnóstico.....	26
3.1.6. Tratamiento	49
3.2. MELATONINA	63
3.2.1. Síntesis.....	63
3.2.2. Secreción	65
3.2.3. Toxicidad.....	67
3.2.4. Efectos	67
3.2.5. La melatonina como potente antioxidante.....	73
3.2.6. Efecto hepatoprotector de la melatonina	80
4. ESTUDIOS PREVIOS	110
5. HIPÓTESIS	116
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	117
6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	117
6.2. POBLACIÓN A ESTUDIO.....	117
6.2.1. Modelo y muestra: animal de experimentación.....	117
6.2.2. Criterios de inclusión.....	118

6.2.3. Criterios de exclusión	119
6.2.4. Justificación del tamaño muestral	119
6.3. DESARROLLO DEL ESTUDIO	120
6.3.1. Grupos de estudio	120
6.3.2. Inducción de la esteatosis hepática	122
6.3.3. Administración de melatonina	123
6.3.4. Diagnóstico de esteatosis	124
6.3.5. Quirófano. Intervención quirúrgica y anestesia	124
6.3.6. Toma de muestras	129
6.3.7. Reanimación	130
6.3.8. Sacrificio	130
6.3.9. Procedimiento para la medición de parámetros de estrés oxidativo.	131
6.3.10. Procedimiento para la medición de parámetros bioquímicos de muestra sanguínea	139
6.3.11. Procedimiento para el análisis histológico de la biopsia hepática ..	140
6.4. VARIABLES A ESTUDIO	146
6.4.1. Características generales	146
6.4.2. Estudio bioquímico de la muestra sanguínea	147
6.4.3. Estudio bioquímico de estrés oxidativo en la biopsia hepática	148
6.4.4. Análisis histológico de la biopsia hepática	149
6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	150
6.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS, FINANCIACIÓN Y CONFLICTO DE INTERESES	151
7. RESULTADOS	152
7.1. GRUPOS DE ESTUDIO	153
7.2. DESCRIPCIÓN MACORSCÓPICA	154
7.3. ESTEATOSIS ALCANZADA	157
7.4. PESO	160

7.5. ANÁLISIS SEROLÓGICOS.....	164
7.5.1. Análisis serológicos por grupos.....	164
7.5.2. Análisis de los diferentes parámetros serológicos.....	169
7.6. ANATOMÍA PATOLÓGICA	197
7.6.1. Grado de esteatosis analizado bajo visión directa del patólogo	199
7.6.2. Grado de esteatosis analizado con el programa de tratamiento de imágenes.....	205
7.6.3. Grado de esteatosis analizado por patólogo vs grado de esteatosis analizado por programa de tratamiento de imágenes	210
7.7. MEDICIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO: MDA Y CARBONILOS.....	213
7.7.1. MDA.....	213
7.7.2. Carbonilos	216
8. DISCUSIÓN	220
8.1. LA MELATONINA COMO POTENTE ANTIOXIDANTE.....	222
8.2. MODELO EXPERIMENTAL: ANIMALES Y DIETA	224
8.3. ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA.....	230
8.3.1. Vía de administración.....	230
8.3.2. Dosis de melatonina	231
8.4. ESTUDIO PILOTO. ESTUDIOS PREVIOS	232
8.5. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL HÍGADO ESTEATÓSICO	232
8.6. PESO DE LOS ANIMALES	234
8.7. ANÁLISIS SEROLÓGICOS: LÍPIDOS PLASMÁTICOS Y MARCADORES FUNCIÓN HEPÁTICA	236
8.7.1. Lípidos plasmáticos	236
8.7.2. Marcadores de función hepática.....	240
8.8. ANATOMÍA PATOLÓGICA	247
8.8.1. Grado de esteatosis analizado bajo visión directa del patólogo	248
8.8.2. Grado de esteatosis analizado con el programa de tratamiento de imágenes.....	249

8.8.3. Grado de esteatosis analizado por patólogo vs grado de esteatosis analizado por programa de tratamiento de imágenes	253
8.9. MEDICIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO: MDA Y CARBONILOS.....	258
8.10. CONCLUSIONES GENERALES.....	262
8.11. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	264
8.12. FORTALEZAS DEL ESTUDIO	265
9. CONCLUSIONES	267
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	268
ANEXO I: INFORME DEL COMITÉ ÉTICO	291

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Fig.1. Metabolismo del hepatocito	10
Fig.2. Efectos de la resistencia insulínica en el metabolismo lipídico	11
Fig.3. Esquema de los procesos bioquímicos que inducen el acúmulo de ácidos grasos libres en el hígado	12
Fig.4. Hipótesis tradicional de los 2 “hits”	13
Fig.5. Hipótesis de los 2 “hits” modificada.....	14
Fig.6. Esquema que resume las probables vías de progresión de esteatosis a esteatohepatitis ...	14
Fig.7. Tercer “hit”: proliferación anómala de células hepáticas inmaduras.....	20
Fig.8. Ecografía hepática: hígado con ecos refringentes, comparados con el riñón.....	32
Fig.9. Ecografía hepática de un hígado con grado 2 de esteatosis	33
Fig.10. Ecografía hepática de un hígado con esteatosis grado 3.....	34
Fig.11. TC hepático con contraste donde se aprecia la diferencia de atenuación entre el hígado y el bazo	35
Fig.12. A la izda TC sin contraste donde no se puede discernir entre la densidad del hígado con respecto al bazo. A la dcha, sin embargo, la administración de contraste intravenoso permite apreciar esta diferencia.....	35
Fig.13. Imagen de RMN que muestra esteatosis severa (intensidad de señal del hígado más baja que músculo paravertebral y bazo).....	37
Fig.14. Tricrómico de Masson 200x: las zonas de fibrosis hepática se observan de color azul .	41
Fig.15. Tinción de Van Gieson	41
Fig.16. Tinción de rojo Sudán: se observa la grasa de color rojo	41
Fig.17. Lipogranuloma portal (HE 400x).....	42
Fig.18. A la izquierda cuerpos de Mallory (HE 600x). A la derecha cuerpos de Mallory (TM 600x)	42
Fig.19. Esteatosis centrolobulillar. Se observa la disposición de los hepatocitos con degeneración grasa en torno a la vena centrolobulillar	43

Fig.20. Esteatosis periportal. Se observa la disposición de los hepatocitos con degeneración ..	43
Fig.21. Esteatosis panacinar	44
Fig.22. Esteatosis microvesicular: citoplasma de los hepatocitos ocupado por pequeñas gotas de grasa.....	44
Fig.23 Esteatosis macrovesicular: se observan hepatocitos esteatósicos (macrovesículas) en todo el campo	45
Fig.24 Hepatocitos balonizados (HE 600x)	47
Fig.25 Esteatosis macro y microvesicular con arquitectura desestructurada con importante fibrosis periportal y perisinusoidal (TM 10x)	48
Fig.26 Molécula de melatonina.....	63
Fig.27 Esquea que muestra la síntesis de melatonina a través de su precursor el triptófano en vertebrados y en plantas.	65
Fig.28 El papel de la mitochondria en la muerte celular apoptótica y en la necrosis tisular. La sobreproducción de ROS supone la peroxidación lipídica, la pérdida de la integridad de la membrana y el aumento del citocromo c en el citoplasma celular.....	74
Fig.29 Cascada de reacciones que se producen cuando la melatonina interactúa con ROS	75
Fig.30 Fases de la peroxidación lipídica	77
Fig.31 Interacciones de las células endoteliales y de las células sinusoidales durante el daño hepático por isquemia-reperfusión.....	90
Fig.32 Relación entre la melatonina y la disfunción endotelial en el daño isquemia-reperfusión.....	93
Fig.33 Vías de actuación de la melatonina en el daño hepático por isquemia-reperfusión.....	95
Fig.34 Posibles mecanismos de acción de la melatonina en la enfermedad hepática no alcohólica	99
Fig.35 Ecografía hepática y biopsia mediante tru-cut transcutánea.....	110
Fig.36 HE 20x (80% esteatosis).....	112
Fig.37 Tras 4 sem de melatonina HE 20X (80% esteatosis).....	112
Fig.38 HE 20x (80% esteatosis).....	112
Fig.39 Tras 4 sem de melatonina HE (80% esteatosis).....	112
Fig.40 HE 20x (90% esteatosis).....	113

Fig.41 Tras 4 sem de melatonina HE 20x (70% esteatosis).....	113
Fig.42 HE 20x (90% esteatosis).....	113
Fig.43 Tras 4 sem de melatonina HE 20x (80% esteatosis).....	113
Fig.44 HE 20X (90% esteatosis).....	114
Fig.45 Tras 4 sem de melatonina HE 20x (80% esteatosis).....	114
Fig.46 HE 20x (90% esteatosis).....	114
Fig.47 Tras 4 sem de melatonina HE 20x (90% esteatosis).....	114
Fig.48 Imagen que muestra a uno de los credos del studio, de raza Largue White.....	118
Fig.49 Esquema de la distribución de los grupos, en rojo dieta esteatósica, en azul dieta basal	121
Fig.50 Cateterización de vía periférica en la oreja e intubación del animal en decúbito prono	125
Fig.51 Animal anestesiado y colocado en decúbito supine para realizar la laparotomía	126
Fig.52 Laparotomía del cerdo, de aproximadamente 10 cms.....	127
Fig.53 Imagen de laparotomía en el cerdo donde se observa el contraste de color entre el hígado esteatósico (en la parte superior de la imagen) de color rojizo-amarillento y el bazo (en la parte inferior de la imagen).....	127
Fig.54 Esquema de la anatomía hepática porcina	127
Fig.55 Laparotomía del cerdo y toma de una muestra en cuña de tejido hepático.....	128
Fig.56 Cierre de la laparotomía mediante sutura continua.....	128
Fig.57 Aspecto final de la herida quirúrgica tras la aplicación de un spray de plata	128
Fig.58 Recipientes utilizados para la toma de muestras.....	129
Fig.59 Animales en jaulas recuperándose de la anestesia	130
Fig.60 Agitador vortex Heidolph® REAX 2000	132
Fig.61 Baño termostatzado con agitación Bunsen® BTG-1	132
Fig.62 Centrífuga Beckman® Avanti 30™.....	132
Fig.63 Espectrofotómetro Beckman-coulter® DU800.....	133
Fig.64 Homogeneizador Ultra-Turrax Janke&Kunkel® T25	133
Fig.65 Protocolo de cuantificación de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA).....	136
Fig.66 Fundamento de cuantificación de restos carbonilo en las proteínas	138

Fig.67 Analizador automático del laboratorio de bioquímica del HCU Lozano Blesa.....	139
Fig.68 Zona del analizador automático donde se colocan las muestras en vacutainers	140
Fig.69 Preparaciones con las muestras de los animales etiquetadas con número del animal y fecha, previo al examen histológico	141
Fig.70 4 fotografías seleccionadas del estudio histológico convencional de un cerdo. En el centro de observa la vena centrolobulillar y las cuatro fotografías cada 90° alrededor de la misma (HE 10X)	142
Fig.71 Imagen inicial a 10X, teñida con Hematoxilina-Eosina.....	143
Fig.72 Imagen de esteatosis inicial, incluyendo falsos positivos, como la vena centrolobulillar y el pedículo portal que se eliminaron manualmente. Se observa como bajó el porcentaje de esteatosis de 45,6% a 43,2%.	144
Fig.73 Representación de la carpeta de todos los archivos de cada paciente: archivo con datos estadísticos, archivos con las fotografías procesadas y archivos con las fotografías originales	144
Fig.74 Archivo de texto con el resultado de la esteatosis de las 4 fotografías del mismo cerdo, así como el porcentaje de esteatosis media y la desviación estándar	145
Fig.75 4 fotografías estudiadas por el sistema informático. Centradas por la vena centrolobulillar (en blanco).	145
Fig.76 Esquema que resume la distribución de animales en los diferentes grupos.....	152
Fig.77 Distribución de los animales en los 4 grupos de estudio	154
Fig.78 Aspecto macroscópico de un hígado perteneciente a un animal del grupo de estudio tras dieta esteatósica. Se aprecia el contraste entre el color intensamente amarillento del hígado y el color violáceo del bazo	155
Fig.79 Presencia de ascitis en uno de los animales del grupo estudio. Se observa también el color intensamente amarillento, en contraste con el color violáceo del bazo	155
Fig.80 Aspecto macroscópico de un hígado perteneciente a un animal del grupo control. Se aprecia la coloración rojiza y los bordes agudos.....	156
Fig.81 Esteatosis alcanzada por cada uno de los cerdos del estudio, según patólogo y según programa	157
Fig.82 Esteatosis media alcanzada por cada uno de los grupos, según patólogo y según programa	158
Fig.83 Imagen de microscopía óptica, tinción HE 2x donde se observa una esteatosis del 95%	159

Fig.84 Imagen de microscopía óptica, tinción HE 2x donde se observa una esteatosis del 40%.	159
Fig.85 Peso medio (Kg) pre-post por grupos de estudio	160
Fig.86 Valores medios de los parámetros pre-post para el Grupo 1	165
Fig.87 Valores medios de los parámetros pre-post para el Grupo 2	166
Fig.88 Valores medios de los parámetros pre-post para el Grupo 3	167
Fig.89 Valores medios de los parámetros pre-post para el Grupo 4	168
Fig.90 Diagrama de cajas para la variable Triglicéridos	172
Fig.91 Diagrama de cajas para la variable Colesterol Total	175
Fig.92 Diagrama de cajas para la variable HDL	178
Fig.93 Diagrama de cajas para la variable LDL	181
Fig.94 Diagrama de cajas para la variable B	184
Fig.95 Diagrama de cajas para la variable AST	187
Fig.96 Diagrama de cajas para la variable ALT	190
Fig.97 Diagrama de cajas para la variable GGT	193
Fig.98 Diagrama de cajas para la variable FA	196
Fig.99 Distribución de la esteatosis centrolobulillar, respetando las zonas periféricas del lobulillo hepático (HE 2x)	198
Fig.100 Distribución de la esteatosis periférica, respetando las zonas centrolobulillares (HE 2x)	198
Fig.101 Esteatosis media pre-post por grupos de estudio	199
Fig.102 Porcentaje de cambio medio de esteatosis por grupos	202
Fig.103 Diagrama de dispersión esteatosis pre vista por patólogo - % cambio, en el grupo 1	204
Fig.104 Diagrama de dispersión esteatosis pre vista por patólogo - % cambio, en el grupo 2	204
Fig.105 Porcentaje de esteatosis (programa) media pre-post por grupos de estudio	205
Fig.106 Porcentaje de cambio medio de esteatosis del programa por grupos	208
Fig.107 Diagrama de dispersión esteatosis pre programa - % cambio post-pre, en el grupo 2	209
Fig 108 Porcentaje de esteatosis media pre-post por grupos de estudio.	210
Fig.109 Diagrama de dispersión esteatosis programa pre – esteatosis patólogo pre	211

Fig.110 Diagrama de dispersión esteatosis programa post – esteatosis patólogo post.....	211
Fig.111 Diagrama de dispersión % cambio esteatosis programa - % cambio esteatosis patólogo.....	212
Fig.112 Diagrama de cajas para variable MDA.....	216
Fig.113 Diagrama de cajas para la variable Carbonilos.....	219
Fig.114 Lugar de acción de la melatonina en el proceso de transformación de la NAFLD a NASH	223
Fig.115 Modelos de NAFLD y NASH en ratones inducidos por modificaciones dietéticas....	225
Fig.116 Modelos de NAFLD y NASH en ratones modificados genéticamente.....	226
Fig.117 Animal del grupo 1 en la primera biopsia o tiempo pre, con un grado de esteatosis del 90% (HE 2x). Análisis realizado por patólogo.....	250
Fig.118 Mismo animal que en la imagen anterior, donde se aprecia la mejoría del grado de esteatosis, que es del 70% en esta segunda biopsia (HE 2x). Análisis realizado por patólogo	250
Fig.119 Rejilla sobrepuesta a la imagen microscópica para realizar el conteo de hepatocitos con vacuolas de grasa.....	253

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Ingredientes y composición de la dieta esteatótica.....	122
Tabla 2 Peso en Kg de los animales por grupos.....	162
Tabla 3 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Peso.....	163
Tabla 4 TG por grupo de estudio	170
Tabla 5 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Triglicéridos.....	171
Tabla 6 Colesterol Total por grupos de estudio	173
Tabla 7 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Colesterol Total	174
Tabla 8 HDL por grupos de estudio	176
Tabla 9 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio HDL.....	177
Tabla 10 LDL por grupos de estudio	179
Tabla 11 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio LDL	180
Tabla 12 B por grupos de estudio.....	182
Tabla 13 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Bilirrubina	183
Tabla 14 AST por grupos de estudio.....	185
Tabla 15 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio AST	186
Tabla 16 ALT por grupo de estudio.....	188
Tabla 17 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio ALT	189
Tabla.18 GGT por grupo de estudio.....	191
Tabla 19 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio GGT.....	192
Tabla 20 FA por grupo de estudio.....	194
Tabla 21 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio FA.....	195
Tabla 22 Esteatosis analizada por patólogo por grupos.	200
Tabla 23 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Esteatosis Patólogo ...	202
Tabla 24 Coeficiente de correlación Esteatosis Patólogo Pre vs % cambio.....	203
Tabla 25 Esteatosis analizada por programa por grupos	206

Tabla 26 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Esteatosis Programa ..	208
Tabla 27 Coeficiente de correlación Esteatosis Programa pre vs % Cambio.....	209
Tabla 28 MDA por grupos de estudio.....	214
Tabla 29 Modelo de regresiónlineal. Variable dependiente % cambio MDA	215
Tabla 30 Carbonilos por grupos de estudio.....	217
Tabla 31 Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Carbonilos	218

1. JUSTIFICACIÓN DEL TEMA

La incidencia de la esteatosis hepática se está incrementando en la actualidad, particularmente en los países occidentales, de forma paralela al incremento de la obesidad, constituyendo a día de hoy una auténtica epidemia a nivel mundial.

Aunque inicialmente la esteatosis hepática cursa de manera asintomática, aproximadamente la mitad de los casos pueden acabar en esteatohepatitis y en cirrosis hepática, por lo que su pronóstico a largo plazo es incierto.

Las recomendaciones en cuanto al tratamiento de la esteatosis hepática de origen no alcohólico, se basan hoy en día en cambios en el estilo de vida, incluidas las restricciones en la ingesta y dietas especiales, encaminados a la pérdida de peso y en el ejercicio físico. Se han investigado y ensayado numerosos fármacos para el tratamiento de la esteatosis hepática, sin embargo, ninguno de ellos ha conseguido una eficacia suficiente para recomendarlo de manera sistemática en todos los pacientes diagnosticados de esteatosis hepática. Así pues no existe hoy en día un tratamiento farmacológico específico, inocuo y eficaz para tratar la esteatosis hepática.

El desarrollo de modelos experimentales de esteatosis ha supuesto un gran avance en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y en el ensayo de nuevos medicamentos para revertirla. Entre estos fármacos se encuentra la melatonina, dado que actúa sobre los mecanismos de la peroxidación lipídica, fenómeno común a todos los procesos de acumulación grasa del hígado, ha sido ensayada con mayor o menor éxito en modelos animales o incluso en el humano. Aunque la mayoría de los modelos animales, principalmente en roedores, son una fiel representación de los fenómenos bioquímicos y celulares que ocurren en la esteatosis, no siempre pueden homologarse al humano.

Existen hoy en día pocos modelos de esteatosis en grandes animales, principalmente cerdos. Nuestro grupo de investigación ha diseñado y utilizado un modelo de esteatosis en grandes animales (cerdos Landrace) que semeja los fenómenos moleculares y celulares de la esteatosis, siendo capaz de provocar grados de infiltración grasa no conseguidos por otros modelos.

Por otra parte el grupo de investigación del Prof. Joaquín García del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Univesidad de Zaragoza posee una enorme experiencia en el estudio de la melatonina y sus efectos antioxidantes y modeladores del metabolismo lipídico.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Estudiar el efecto de la melatonina como tratamiento para la reversión de la esteatosis hepática establecida e inducida mediante una dieta especial en un modelo animal porcino, a nivel histológico, bioquímico y molecular.

2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Producir un modelo de esteatosis en el cerdo por medio de alteraciones en la dieta evitando la toxicidad celular directa.
- Estudiar el efecto de la dieta sobre la reversión de la esteatosis inducida en un modelo animal porcino.
- Comparar el método de análisis histológico convencional de detección de esteatosis hepática con el método de análisis digital de las imágenes.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ESTEATOSIS HEPÁTICA

Podemos definir la esteatosis hepática como una enfermedad del hígado caracterizada por acumulación de ácidos grasos, colesterol y triglicéridos en el citoplasma de las células hepáticas. Se trata de una enfermedad multifactorial, y supone una condición patológica en el ser humano. Es una manifestación hepática de multitud de procesos patológicos que ocurren a nivel celular y bioquímico¹.

La tendencia de nuestro organismo a almacenar calorías sobrantes en forma de grasa fue fruto de la adaptación al medio en los tiempos prehistóricos en los que la ingesta regular no estaba garantizada. Este fenómeno ha logrado preservar a la humanidad de los duros avatares de la supervivencia. Pero en situaciones fisiológicas la grasa solo se acumula en los adipocitos, y estas células se encuentran en lugares determinados, no diseminados por toda la economía. De hecho el depósito de grasa en la célula hepática es un proceso patológico que sólo ocurre en circunstancias especiales y nunca como forma de almacenamiento de energía. En el hígado, la sola presencia de grasa intracelular produce una reacción patológica basada en fenómenos inflamatorios, de causa no muy bien conocida capaz de ocasionar una patología tanto a nivel general como del propio órgano.

El mecanismo por el cual las grasas (ácidos grasos, triglicéridos y colesterol) se acumulan en la célula hepática no es bien conocido en la actualidad, se considera que el depósito de grasa es el paso final común de múltiples procesos biológicos y metabólicos que afectan al organismo en general y no solo al propio hígado.

Una de las características importantes de esta afección es que es una enfermedad que afecta de forma difusa a toda la víscera, es decir los depósitos de grasa no se localizan en una determinada parte o porción del hígado (aunque a nivel ultraestructural suelen acumularse en determinadas partes del lobulillo hepático), si no que los hepatocitos infiltrados por grasa se distribuyen homogéneamente por toda la anatomía hepática.

Distinguimos dos tipos de enfermedad hepática en función del mecanismo fisiopatogénico²:

- Enfermedad hepática de origen alcohólico (EHH): producida por los efectos tóxicos del consumo de alcohol.
- Enfermedad hepática no alcohólica (EHNA) o Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): cuyo origen es multifactorial. A esta entidad nos referiremos en lo sucesivo. Se presenta en sujetos que no beben alcohol o beben de forma moderada (<20 g/día) y se considera como la expresión en el hígado de un síndrome complejo que se denomina síndrome metabólico. NAFLD incluye dos entidades clínicas:
 - Hígado graso no alcohólico o Non Alcoholic Fatty Liver (NAFL): este término hace referencia a la presencia de esteatosis hepática sin evidencia de daño hepatocelular ni fibrosis. La progresión hacia cirrosis y fallo hepático es mínima.
 - Esteatohepatitis no alcohólica o Non Alcoholic Steatohepatitis (NASH): presencia de esteatosis hepática asociada a inflamación y daño hepático con o sin fibrosis. Puede progresar hacia cirrosis, fallo hepático y hepatocarcinoma.

El síndrome metabólico comprende una serie de alteraciones entre las que destacan la obesidad (especialmente la obesidad central), la resistencia a la insulina, la intolerancia a los hidratos de carbono o bien DM tipo II, dislipemia con aumento de la cifra de triglicéridos en suero > 150 mg/dl, disminución de las lipoproteínas de alta densidad con cifras < 40 mg/dl en el hombre y < 50 mg/dl en la mujer e hipertensión arterial > 140/90. Por lo tanto, la NAFLD se considera la manifestación hepática del síndrome metabólico.

La NAFLD desde el punto de vista histológico, es una enfermedad en la que se producen un espectro de lesiones en el tejido hepático que va desde un simple depósito de lípidos en el citoplasma hasta la inflamación, la fibrosis y la cirrosis hepática³.

3.1.1. ETIOLOGÍA

La NAFLD se ha asociado con numerosos factores etiológicos, y puede clasificarse como primaria, relacionada con los factores que provocan el aumento de la resistencia a la insulina (obesidad, diabetes o dislipemia) y secundaria a alteraciones metabólicas congénitas o adquiridas, nutricionales, procedimientos quirúrgicos, fármacos y otros tóxicos. En la práctica clínica, la mayoría de los pacientes con NAFLD presentan obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM tipo 2) o dislipemia como factores etiológicos, y es frecuente la asociación de varios de estos factores.

Las causas de NAFLD secundaria comprenden⁴:

- Causas metabólicas
 - Abeta lipoproteinemia.
 - Galactosemia.
 - Fructosemia.
 - Síndrome de Alstrom.
 - Enfermedades por almacenamiento de ésteres de colesterol.
 - Enfermedades del almacenamiento del glucógeno.
 - Déficit de Carnitina.
 - Enfermedad de Weber-Christian.
 - Síndrome de Bardet-Biedl.
 - Síndrome de ovario poliquístico.
 - Síndrome de Prader Willi.
 - Síndrome de Turner.
 - Hígado graso agudo del embarazo.
 - Fibrosis quística.
 - Glucogenosis.
 - Enfermedad de Wilson.
 - Enfermedad de Wolman.
 - Defectos del ciclo de la urea.
 - Defectos mitocondriales⁵ y peroxisomales de la oxidación de ácidos grasos⁶.

- Causas nutricionales:
 - Desnutrición y pérdida de peso grave.
 - Nutrición parenteral total.
 - Síndrome de realimentación.
 - Bypass yeyuno-ileal (cirugía de la obesidad).
 - Sobrecrecimiento bacteriano en el intestino.
 - Enfermedad celíaca.
 - Síndrome de Kwashiorkor.
- Causas farmacológicas⁷ (fármacos y toxinas):
 - Amiodarona.
 - Didanosina.
 - L-asperginas.
 - Nicardipina.
 - Nifedipina.
 - Exceso de vitamina A.
 - Ácido valproico.
 - Zidovudina.
 - Metotrexate (y cualquier otro quimioterápico, ya que la gran mayoría se metabolizan en el hígado).
 - Espironolactona.
 - Sulfasalacina.
 - Naproxeno.
 - Aminosalicilatos.
 - Diltiazem.
 - Tetraciclina.
 - Antiretrovirales.
 - Glucocorticoides.
 - Tamoxifeno.
 - Estrógenos.
 - Hepatotoxinas (fósforo, hongos, productos petroquímicos).
 - Aspirina.
 - Cocaína.

- Otras causas:
 - Enfermedad inflamatoria intestinal.
 - Infección por virus de inmunodeficiencia humana.
 - Hepatitis C.
 - Déficit de alfa-1 antitripsina.
 - Enfermedades crónicas hepáticas: hemocromatosis, enfermedad hepática autoinmune, hepatitis viral crónica y enfermedad de Wilson.

3.1.2. FISIOPATOGENIA

La fisiopatología de la esteatosis hepática y de la esteatohepatitis no es bien conocida. La acumulación de grasa en los hepatocitos suele ser el final de sucesivos procesos metabólicos alterados, que utilizan diversos mediadores, con vías metabólicas comunes y acelerados por varios estímulos⁸.

A pesar de haberse propuesto un gran número de teorías para explicar la progresión de esteatosis a esteatohepatitis, todavía no comprendemos los mecanismos patogénicos íntimos de la progresión de esta enfermedad. Tampoco conocemos porqué en algunos individuos la esteatosis hepática permanece silente mientras que en otros es capaz de progresar a esteatohepatitis y a cirrosis sin causa aparente.

La mayoría de los estudios tienen como base la explicación realizada por Day en 1998⁹, teoría basada en dos impactos, dos “hits” o dos etapas de la enfermedad. Durante el primer “hit” suceden una serie de acontecimientos intracelulares que determinan la acumulación de grasa en el hígado, lo cual lo vuelve más vulnerable a la aparición del segundo “hit” o daño hepático mediado por agentes proinflamatorios como las citoquinas que conducen al estrés oxidativo y al daño mitocondrial, por el que tiene lugar la progresión de la enfermedad hacia esteatohepatitis y/o fibrosis^{10,11}.

3.1.2.1. Primer hit: acumulación de grasa en el hígado y resistencia insulínica

Acumulación de grasa

Los ácidos grasos libres (AGL) surgen en el hígado de tres fuentes distintas: lipólisis del tejido adiposo (hidrólisis de AGL y glicerol de triglicéridos), fuentes dietéticas y síntesis de novo o lipogénesis (estimulada por la hiperinsulinemia). A su vez, los AGL pueden sufrir β -oxidación, o pueden ser utilizados para reesterificación de triglicéridos (TG), que a su vez pueden ser almacenados en forma de gotitas de lípidos o exportados como lipoproteína de muy baja densidad (VLDL).

Por lo tanto, la acumulación de grasa en el hígado puede ser el resultado del incremento de la síntesis de grasa, el aumento de la llegada de grasa, la disminución de la exportación de grasa o disminución de la oxidación de grasa. Si la captación y la síntesis supera la β -oxidación y la exportación de los mismos, nos encontramos ante una situación de desequilibrio¹² (Fig.1).

NAFLD se caracteriza por la acumulación de TG, que se forman a partir de la esterificación de AGL y glicerol dentro del hepatocito.

La importación excesiva de AGL por parte del hígado puede ocurrir por un aumento de la liberación de TG (como se ve en pacientes obesos que pierden rápidamente peso) o por una excesiva conversión de hidratos de carbono y proteínas a triglicéridos (como se ve en la hiperalimentación o en pacientes con nutrición parenteral total)¹³.

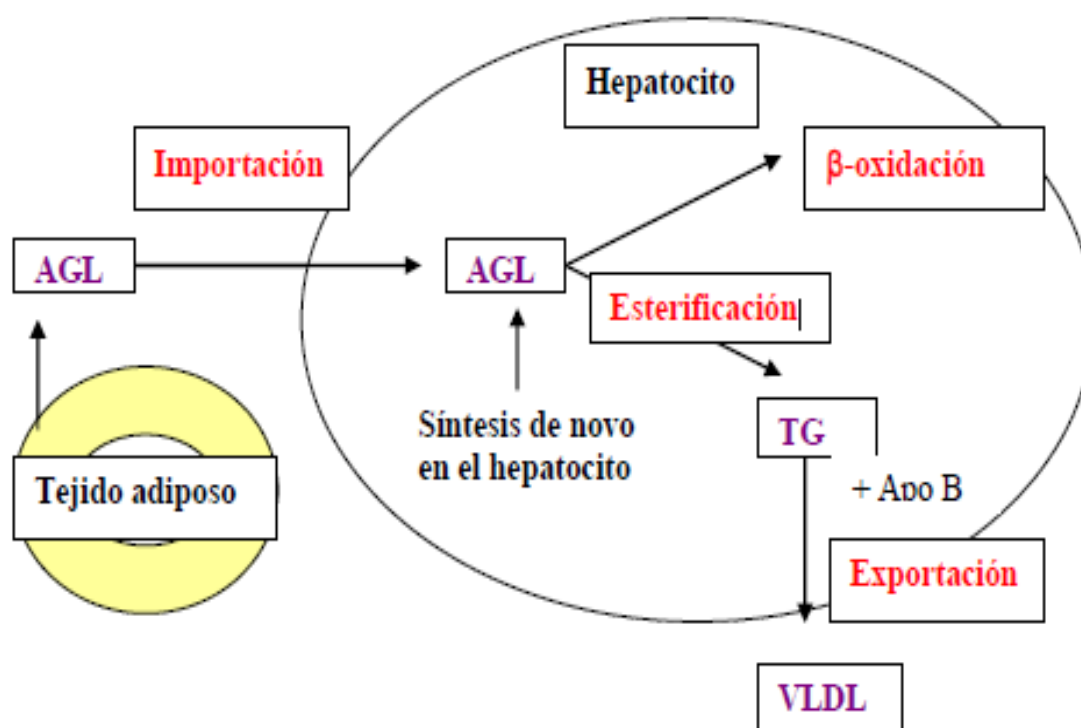


Fig.1. Metabolismo lipídico en el hepatocito 1.

Resistencia insulínica

En esta primera etapa de la patogenia de la acumulación de lípidos en el hepatocito, parece que tiene especial importancia el papel de la resistencia insulínica. La resistencia insulínica es la incapacidad de la insulina para mantener los niveles de glucosa sanguíneos y tisulares de manera fisiológica. La consecuencia es que el páncreas secreta una mayor cantidad de insulina como mecanismo compensador. La acción de la resistencia a la insulina se manifiesta sobre todo en el tejido adiposo y en el hígado, aunque la repercusión secundaria afecta a todos los tejidos en general.

En condiciones normales, la insulina promueve la glucogénesis, la lipólisis del tejido adiposo periférico y la lipogénesis en el hígado, es decir, la conversión de los AGL de la circulación general en TG mediante la β -oxidación de los mismos en las mitocondrias del hepatocito o a través de un proceso de reesterificación. Los TG que así se forman, son excretados fuera del hígado a través de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)¹⁴.

La hiperinsulinemia produce un aumento de la lipólisis periférica, con un aumento de los niveles circulantes, que son captados por el hepatocito. Además se produce un incremento de la captación de AGL por parte del hígado y un aumento de la síntesis de triglicéridos de novo. Teniendo materia prima (los AGL) en excedente, no los podemos β -oxidar a ritmo normal (saturación de la β -oxidación). Además se ve aumentada la producción de TG, que además sufre la deficiencia de apolipoproteína B (Apo B), con lo cual son exportados en menor cuantía. El resultado final es la acumulación de grasa en el hígado¹⁵ (Fig.2 y Fig.3).

Las partículas VLDL se forman mediante la incorporación de triglicéridos en la (ApoB) mediante la proteína de transferencia mitocondrial (MTP). Las alteraciones entre esta proteína y la apoB en cuanto a síntesis y secreción han sido propuestas como posibles mecanismos fundamentales de la patogénesis de la disminución de la capacidad de exportación de lípidos¹⁶.

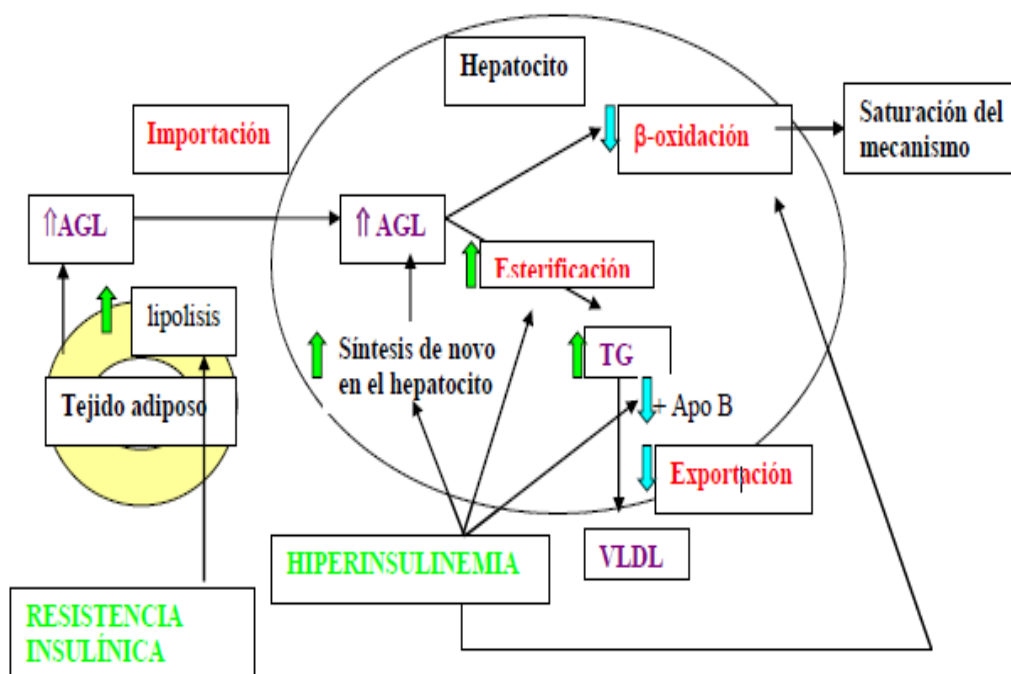


Fig.2. Efectos de la resistencia insulínica en el metabolismo lipídico.

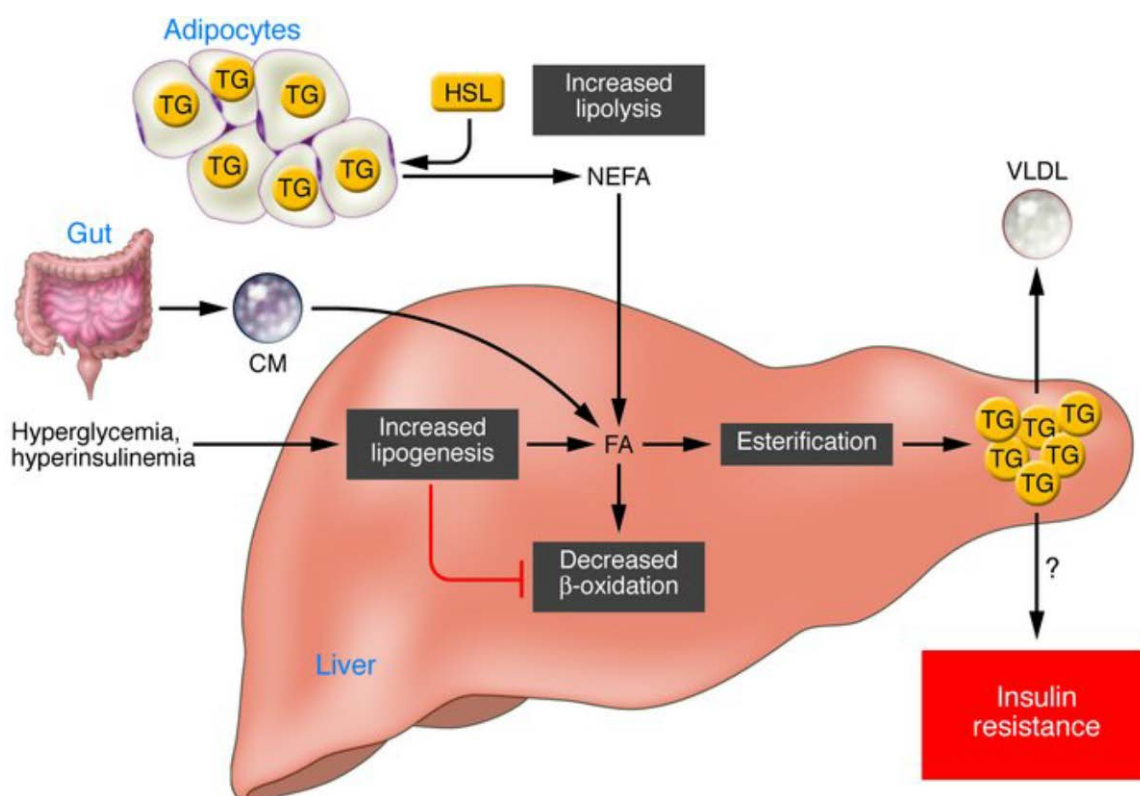


Fig.3. Esquema de los procesos bioquímicos que inducen el acúmulo de ácidos grasos libres en el hígado.

Donnelly et al. utilizó un método de múltiples isótopos estables para demostrar que en los individuos con NAFLD, aproximadamente el 60% de los TG hepáticos provienen de la lipólisis del tejido adiposo, el 26% de la lipogénesis y el 15% de la dieta¹⁷. Contrastando con los individuos sanos, en los que el 5% de los AGL provienen de la lipólisis del tejido adiposo periférico.

3.1.2.2. Segundo hit: hacia la inflamación y la fibrosis hepática

Tras un primer impacto el hepatocito esteatósico se vuelve más sensible a la acción de una serie de mediadores inflamatorios (citoquinas y adipocinas), a la disfunción mitocondrial y al estrés oxidativo, que a su vez conducen a la esteatohepatitis o fibrosis, situación irreversible (Fig.4).

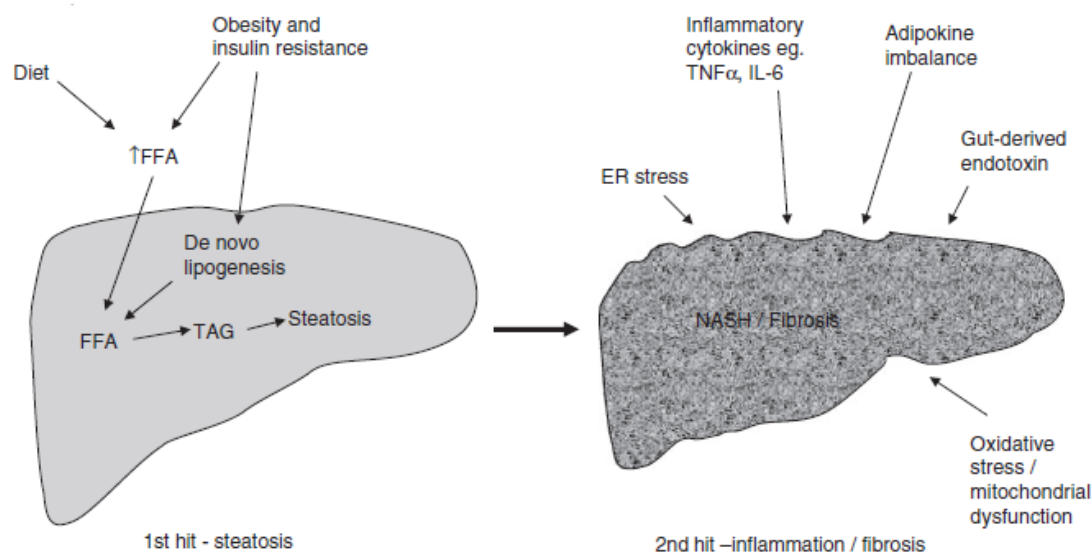


Fig.4. Hipótesis tradicional de los 2 “hits”.

Sin embargo, el papel de los AGL en la producción directa de lesiones hepáticas, ha hecho modificar esta teoría. En la obesidad y en la resistencia insulínica existe un aumento de AGL en el hígado, por aumento de la lipólisis y de la lipogénesis. Esta situación de hiperinsulinismo en el hepatocito bloquea la β -oxidación y la excreción de ácidos grasos a través de lipoproteínas VLDL, lo cual da lugar a un incremento de AGL y de TG en el hígado¹⁸ (Fig.5). Actualmente hay evidencia de que los AGL pueden causar toxicidad mediante activación de citoquinas inflamatorias y estimulando el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial¹⁹. La presencia de TG en los hepatocitos (esteatosis) junto con la resistencia insulínica y la presencia de grandes cantidades de AGL inducen una respuesta inflamatoria mediada por citoquinas, óxido nítrico (NO), radicales libres de oxígeno (ROS) y otros mediadores, que conducen a la producción de colágeno, fibrosis y cirrosis hepática. Así pues, el hepatocito se comporta como una fuente de mediadores inflamatorios que son liberados a la circulación, agravando la resistencia insulínica.

La forma menos agresiva para las células de acumular grasa es en forma de TG, mientras que los AGL son particularmente tóxicos para las células.

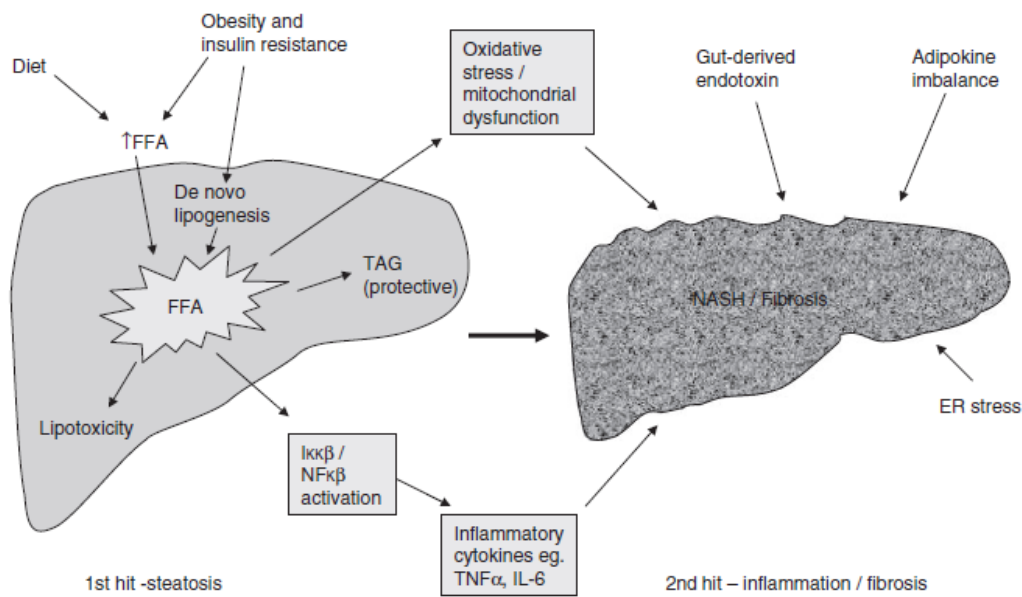


Fig.5. Hipótesis de los 2 “hits” modificada.

Por lo tanto, la progresión de esteatosis a esteatohepatitis resulta de una interrelación de mecanismos de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, citoquinas proinflamatorias, adipocinas, exceso de glucocorticoides y sobrecrecimiento bacteriano; unido todo ello a una predisposición genética individual (Fig.6).

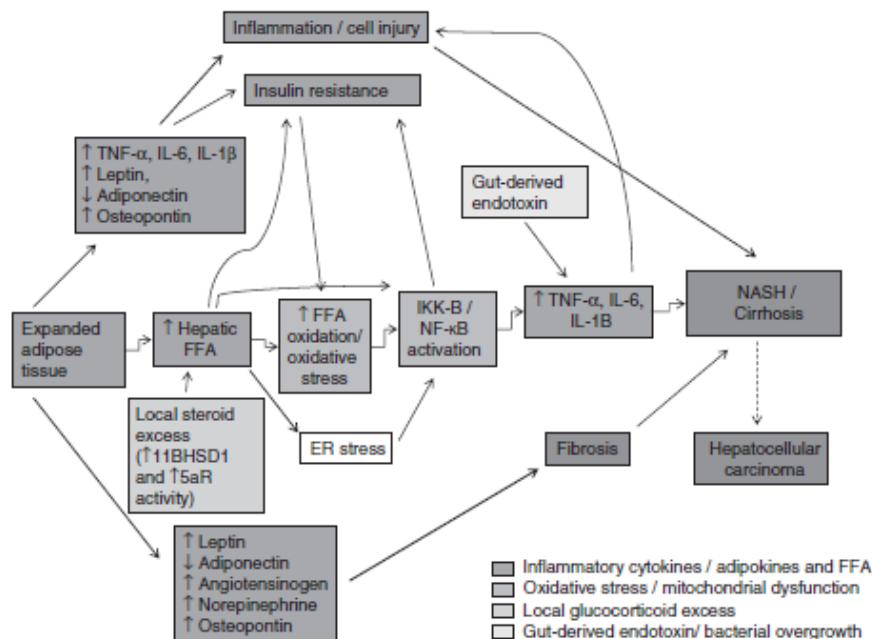


Fig.6. Esquema que resume las probables vías de progresión de esteatosis a esteatohepatitis.

Citoquinas

La síntesis aumentada de AGL que ocurre en sujetos obesos y con resistencia insulínica, promueve un fenómeno inflamatorio con activación de los macrófagos. Estos sintetizan TNF- α y citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-8, las cuales provocan una síntesis de proteína C reactiva en el propio hígado. Estas citoquinas promueven activamente la inflamación y pueden generar un círculo vicioso de actividad inflamatoria local.

La presencia de esteatosis está fuertemente asociada con el desarrollo de inflamación hepática crónica, mediada por la activación de la vía de señalización Ikk-b/NF-kB. NF-kB o factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas es un complejo proteico que controla la transcripción del ADN. NF-kB está implicado en la respuesta celular frente a estímulos como el estrés, las citoquinas y otros agentes dañinos. En su estado inactivo, el NF-kB se encuentra en el citosol formando un complejo con la proteína inhibidora IkkB. En modelos murinos de dieta rica en grasas, aumenta la actividad de NF-kB, que está asociada a la elevación de citoquinas inflamatorias tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 1b (IL-1b) y la activación de las células de Kupffer²⁰. La inhibición de NF-kB específica del hígado previene la expresión de genes inflamatorios inducidos por la dieta rica en grasas. Mientras que la hiperglucemia y la resistencia insulínica producida por una dieta alta en grasas puede ser reproducida por sobre-expresión selectiva de Ikk-b²⁰. Ikk-b/NF-kB en los hepatocitos también puede ser activado directamente por los AGL. Las citoquinas liberadas mediante esta vía pueden replicar todas las características asociadas con la esteatohepatitis: quimiotaxis de neutrófilos, apoptosis, necrosis de hepatocitos, formación de cuerpos de Mallory, activación de células estrelladas, etc¹⁰.

Adipoquinas

El tejido adiposo no es sólo un sitio inerte de almacenamiento de energía, sino un órgano endocrino de secreción activa. Las adipoquinas son citoquinas derivadas de los adipocitos. Así pues, las adipoquinas son hormonas sintetizadas en el propio tejido adiposo por los adipocitos y las células del estroma, que tienen acciones muy complejas

y todavía no bien comprendidas, no sólo en el tejido graso. Entre sus funciones se encuentra la de regular la sensibilidad a la insulina del hígado a nivel celular (hepatocito), regulación que se encuentra modulada, a su vez, por multitud de receptores de membrana y citoplasmáticos⁸.

Entre las adipoquinas más importantes se encuentran la adiponectina y la leptina. Otras adipoquinas son la resistina, la visfatina y omentina, aunque probablemente hay muchas más.

La leptina es una hormona producida principalmente por los adipocitos maduros cuyas acciones incluyen la regulación de la ingesta (efectos anorexígenos sobre el hipotálamo), la regulación de los gastos energéticos (aumenta el metabolismo basal), la regulación del sistema inmunológico), la promoción de la inflamación y la fibrogénesis. También tiene un efecto lipolítico y de disminución de la lipogénesis. En pacientes obesos y con NAFLD se observan niveles elevados de leptina, considerándose que los obesos tienen un estado de resistencia a la leptina^{21,22}.

Sin embargo, al contrario que la leptina, los niveles de adiponectina son inversamente proporcionales al contenido de grasa corporal y se reducen en pacientes con NAFLD. La adiponectina es antiinflamatoria y aumenta la sensibilidad a la insulina²³. La adiponectina antagoniza los efectos de TNF- α y se ha demostrado que mejora la hepatomegalia así como las características bioquímicas y los parámetros histológicos de NAFLD.

La resistina, es otra de las hormonas producidas en el tejido adiposo. Tiene un papel importante dentro de la respuesta inflamatoria²⁴, ya que incrementa la síntesis de ciertas citoquinas proinflamatorias. Se han encontrado también cifras de resistina elevadas en pacientes obesos correlacionándose con el Índice de Masa Corporal (IMC) y sobre todo con la adiposidad visceral. También se han encontrado correlaciones positivas entre los niveles de la hormona y la resistencia a la insulina.

Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

El papel del estrés oxidativo y de la disfunción mitocondrial en la esteatohepatitis está bien establecido. Estadíos finales de la enfermedad se correlacionan con mayores grados de estrés oxidativo²⁵⁻²⁷. La β -oxidación en condiciones normales tiene lugar en el hepatocito en el interior de la mitocondria. En un contexto de NAFLD este proceso puede estar saturado como resultado del aumento de AGL, dando lugar al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS)²⁸. ROS induce el estrés oxidativo, la activación de vías inflamatorias y el daño mitocondrial.

Existen estudios^{5,29} que demuestran que los pacientes con NASH poseen alteraciones estructurales mitocondriales que reflejan un defecto en la β -oxidación de los AGL, defectos que no se encuentran en los pacientes con esteatosis hepática pero sí en los que tienen NASH. Así pues, los pacientes con resistencia a la insulina que poseen estos defectos mitocondriales presentan, a través de la formación de ROS, la aparición de los fenómenos inflamatorios que ocurren en la NASH. Los ROS y los aldehídos inducen estrés oxidativo y muerte celular por depleción de ATP y enzimas antioxidantes (glutación), daño directo al ADN y a las proteínas. Inducen la producción de citoquinas proinflamatorias, las cuales estimulan la quimiotaxis de los neutrófilos y finalmente acaban activando las células estrelladas hepáticas que promueven la fibrosis al sintetizar enormes cantidades de colágeno.

Otra teoría consiste en que los ROS y los metabolitos de la peroxidación lipídica disminuyen la actividad de las enzimas antioxidantes (glutación) y otros antioxidantes (vitamina E, vitamina C), haciendo más sensibles las células al daño por los radicales libres. La administración de vitamina E ha sido capaz de revertir la esteatosis hepática en niños con esteatosis normalizando las enzimas hepáticas. Otro estudio demuestra que la administración durante 6 meses de vitamina e + vitamina C mejora la inflamación y fibrosis hepática⁸.

Estrés del retículo endoplásmico y sobrecrecimiento bacteriano

Otros mecanismos implicados en la patogénesis de la esteatohepatitis incluyen el estrés del retículo endoplásmico y la endotoxemia derivada del intestino^{10,30}. El estrés del retículo endoplásmico puede ser causado por una gran variedad de situaciones de estrés incluyendo la hiperinsulinemia y la hiperlipidemia, lo cual puede resultar en la activación de varias vías que conducen a la resistencia insulínica, la inflamación, la apoptosis y la disfunción mitocondrial¹⁰.

Por otra parte, el sobrecrecimiento excesivo de bacterias intestinales se ha encontrado con mayor frecuencia en pacientes con esteatohepatitis en comparación con los controles. El sobrecrecimiento bacteriano da lugar a la producción de etanol³¹ y a la liberación de lipopolisacáridos bacterianos, que pueden activar la producción de TNF- α por las células de Kupffer y así inducir la inflamación hepática³². Esta teoría puede explicar el inicio de la fibrosis hepática como complicación de la cirugía del bypass yeyunoileal. Esta hipótesis está apoyada por estudios que demuestran que el tratamiento con antibióticos y probióticos puede reducir la inflamación hepática tanto en animales como en seres humanos^{33,34}.

Glucocorticoides

Los glucocorticoides, tanto de fuentes exógenas como endógenas, son una causa bien reconocida de NAFLD. Pacientes con síndrome de Cushing, desarrollarán unas características metabólicas como la resistencia insulínica y un fenotipo de obesidad central. Es importante destacar que estos pacientes también desarrollarán esteatosis hepática³⁵.

Los mecanismos por los que los glucocorticoides inducen la acumulación de grasa en el hígado incluyen la inhibición de la β -oxidación de los ácidos grasos y la estimulación de la lipogénesis en el hepatocito.

Hierro

Algunas teorías³⁶ más recientes implican al aumento de la captación de hierro por parte del hígado en la aparición de la NAFLD, el cual puede tener un papel relevante. Prueba de ello es que la resistencia a la insulina está relacionada con un aumento de los niveles de hierro en el hígado. La mejoría de los niveles de hierro y ferritina séricos favorece el control de la insulina.

Hipoxia

La hipoxia se ha preconizado como uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de la resistencia a la insulina y de la inflamación. Estudios animales han demostrado que la hipoxia reduce la secreción de citoquinas proinflamatorias, adipocinas y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La compresión directa de los pequeños vasos de los propios adipocitos aumentados de tamaño por el elevado acúmulo de lípidos pueden provocar isquemia de los tejidos por compresión mecánica, y por otra parte, los fenómenos inflamatorios pueden producir una alteración de la microcirculación que resulte en hipoxia tisular dando lugar a un metabolismo anaerobio y necrosis isquémica. Estos fenómenos de necrosis pueden generar también una sobreproducción de citoquinas proinflamatorias³⁶.

Predisposición genética

Aunque la esteatosis hepática es común en los pacientes con obesidad y resistencia insulínica, sólo una minoría progresará a estatohepatitis y a cirrosis, lo cual sugiere una importante predisposición genética. Los polimorfismos en los genes relacionados con el metabolismo lipídico, la resistencia insulínica, el estrés oxidativo, las citoquinas y adipocinas y la fibrogénesis pueden aumentar la susceptibilidad al desarrollo de esteatohepatitis³⁷.

3.1.2.3. Tercer hit: proliferación anómala de células inmaduras

Se ha sugerido la acción de un tercer golpe o tercer “hit”⁸ para reflejar una proliferación de hepatocitos. En el hígado en condiciones normales, la muerte celular estimula la proliferación de hepatocitos que sustituyen a las células muertas y reconstituyen la función normal de los tejidos. En presencia de estrés oxidativo, la replicación habitual de hepatocitos maduros está inhibida, lo cual conduce a una replicación de células hepáticas inmaduras o progenitoras (célula oval). La proliferación de estas células inmaduras está relacionada con la fibrosis hepática (Fig.7). En la lesión hepática crónica, el desarrollo de fibrosis o cirrosis depende de la eficacia en la regeneración de los hepatocitos.

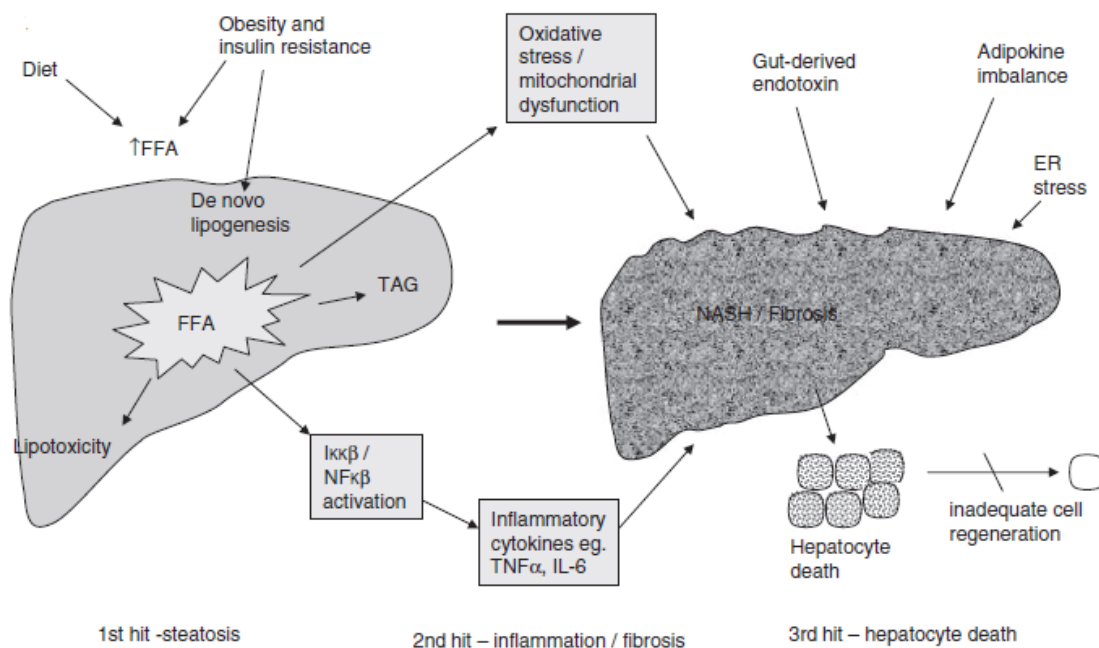


Fig.7. Tercer “hit”: proliferación anómala de células hepáticas inmaduras.

3.1.3. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la EHNA no es bien conocida y probablemente está infravalorada debido a que una gran parte de los pacientes permanecen asintomáticos o presentan alteraciones biológicas discretas, a la ausencia de marcadores serológicos precisos y a la necesidad de realizar una biopsia hepática para el diagnóstico definitivo.

Sin embargo sabemos que la esteatosis es una de las enfermedades hepáticas más prevalentes en el mundo occidental y la principal causa de hepatopatía crónica en la población general.

Suele ser asintomática hasta que la mayor parte de las células hepáticas son afectadas (entorno al 50 %). El hallazgo de hígado graso es relativamente frecuente en la población occidental aparentemente sana, pero es extremadamente frecuente en los pacientes que poseen los siguientes factores de riesgo: alcoholismo, obesidad, sedentarismo, diabetes, metabolopatías, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, ciertos fármacos y tóxicos y con predominio en el sexo femenino.

3.1.3.1. Epidemiología de EHNA en población general

La incidencia de NAFLD real es motivo de controversia en la literatura³⁸. Dos estudios japoneses^{39,40} publicaron una incidencia de 31 y 86 casos respectivamente de sospecha de NAFLD por 1000 personas/año. Otro estudio en Inglaterra⁴¹ mostró menor tasa de incidencia, con 29 casos por 100000 personas/año. Se necesitan más estudios para comprender mejor la incidencia de NAFLD.

La prevalencia reportada de NAFLD varía ampliamente en dependencia de la población estudiada y la definición usada. La prevalencia de alteraciones histológicas NAFLD es de 20-50% en dos estudios diferentes^{42,43} compuesto por potenciales donantes vivos del hígado. En otro estudio⁴⁴ en el que se fijó la prevalencia de esteatosis en función de criterios ultrasónicos reportó una prevalencia de NAFLD entre 17 y 46% dependiendo de la población estudiada. En otro trabajo consistente en casi 400 personas de mediana

edad, la prevalencia de NAFLD medida por ecografía fue del 46% y la prevalencia de NASH histológicamente confirmada fue de 12,2%⁴⁵. En el Dallas Heart Study⁴⁶ se evaluó la prevalencia de NAFLD medida por RM en la población general, siendo del 31%. En resumen, las estimaciones de la prevalencia mundial de NAFLD oscila entre 6,3 y 33% con una mediana del 20%⁴⁴.

3.1.3.2. Epidemiología de NAFLD en grupos de riesgo

La obesidad es un factor de riesgo común y bien documentado para NAFLD. Tanto el IMC excesivo como la obesidad visceral son factores de riesgo reconocidos para la NAFLD.

En pacientes con obesidad severa sometidos a cirugía bariátrica, la prevalencia de NAFLD puede superar el 90% y hasta el 5% pueden tener cirrosis^{44,47-50}. Los pacientes con DM tipo 2 tienen una prevalencia muy alta de NAFLD⁴⁴. Un examen ultrasonográfico en pacientes con DM II mostró una prevalencia del 69% de NAFLD⁵¹. En otro estudio, 127 pacientes de 204 pacientes diabéticos presentaron infiltración grasa en la ecografía, y 87% de los pacientes con infiltración grasa se confirmó mediante biopsia el diagnóstico de NAFLD³⁸.

La esteatohepatitis no alcohólica es menos común, afectando al 2-3% de la población occidental, y a un 37% de los enfermos obesos.

3.1.3.3. Epidemiología en niños y adolescentes

La prevalencia real en niños y adolescentes es desconocida, aunque es muy elevada cuando existe obesidad en el periodo infantojuvenil. Un estudio retrospectivo en el que se analizaron las biopsias de 742 niños entre 2 y 19 años, se encontró una prevalencia ajustada por edad, género, raza y etnia de 9,6%. La prevalencia de hígado graso aumenta con la edad. Esta prevalencia aumentó hasta el 53% en niños obesos⁵².

3.1.3.4. Epidemiología según género

Muchos trabajos han demostrado que el sexo masculino es un factor de riesgo para NAFLD⁴⁴. Por ejemplo, en un estudio con 26527 individuos, la prevalencia de NAFLD fue de 31% en varones y 16% en mujeres⁵³.

3.1.3.5. Epidemiología según grupos étnicos

NAFLD ocurre en todos los grupos étnicos, aunque parece tener una menor prevalencia en los afroamericanos en comparación con los hispanos, europeos y americanos. Esta diferencia está presente aún después de ajustar para obesidad y resistencia insulínica. Puede estar relacionada con las diferencias en la homeostasis lipídica que existen entre las diferentes etnias³⁸.

3.1.3.6. Mortalidad

Los resultados a largo plazo de los pacientes con NAFLD y NASH han sido estudiados en varios trabajos^{54–58}. Las conclusiones pueden resumirse en: los pacientes con NAFLD han aumentado la mortalidad en comparación con las poblaciones de control, la causa más común de muerte en pacientes con NAFLD, NAFL y NASH es la enfermedad cardiovascular y los pacientes con NASH (pero no NAFL) tienen un aumento de la tasa de mortalidad relacionada con el hígado.

3.1.3.7. Importancia

La presencia de esteatosis, sin enfermedad hepática avanzada adquiere especial importancia en tres situaciones concretas: en el trasplante hepático, en las resecciones hepáticas masivas y en la progresión de la enfermedad hacia NASH.

En el trasplante hepático, el injerto puede no ser válido si la esteatosis es excesiva. Los hepatocitos esteatósicos no responden igual a los fenómenos que suceden durante el período de isquemia (fría y caliente) y de reperusión. Las condiciones a las que se someten los hepatocitos durante el período de extracción y conservación ocasionan estrés metabólico celular, lo que puede conducir a una necrosis celular y por tanto disfunción del injerto^{59,60}. Un elevado porcentaje de injertos hepáticos para trasplante son finalmente rechazados por ser considerados subóptimos. Esta circunstancia agrava el problema de escasez de órganos donantes.

La presencia de esteatosis adquiere vital importancia en las resecciones hepáticas límite o extrema, que incluyen aquellas que precisan una isquemia prolongada de más de 90 minutos y la exéresis de un importante volumen de parénquima hepático. Ante esta situación, es importante considerar las características de viabilidad del parénquima hepático remanente. La víscera restante puede no ser suficiente para el mantenimiento de las funciones fisiológicas hepáticas⁶¹. Los hepatocitos esteatósicos resisten peor los períodos de isquemia caliente. Algunos estudios concluyen que la esteatosis hepática por encima del 30% influye en la duración de la cirugía, aumenta las probabilidades de transfusión y se relaciona con un mayor riesgo de fallo hepático precoz y con una mayor mortalidad.

La tercera situación en la que la esteatosis hepática puede originar un problema severo es que la esteatosis es una condición necesaria para el desarrollo de esteatohepatitis no alcohólica o NASH. Esta situación se considera el estadio o fase final de la enfermedad⁴⁴.

3.1.4. EVOLUCIÓN DEL HÍGADO GRASO

La esteatosis hepática se considera la entidad precursora de la esteatohepatitis no alcohólica, situación considerada como irreversible y caracterizada por la presencia de inflamación y fibrosis en el tejido hepático.

Hay ciertos factores que favorecen esta progresión⁶²:

- Edad > 50 años.
- GOT/GPT > 1
- GGT/GPT > 1
- GPT > 2 veces normal
- IMC > 28.
- Resistencia a la insulina.
- Diabetes mellitus tipo 2.
- Hipertensión.
- Hipertrigliceridemia.

Se estima que la NASH ocurre en el 20% de los pacientes con NAFLD (3-12% de la población de los EEUU).

Aproximadamente 30-40% de los pacientes con NASH desarrollará fibrosis.

Adams LA⁶³ comunica una regresión de la esteatosis del 29%, una estabilización del 34% y una progresión a fibrosis del 37%.

3.1.5. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

En la actualidad, la prueba de oro para el diagnóstico de la esteatosis hepática es el análisis histológico mediante biopsia hepática. Se han realizado esfuerzos encaminados al diagnóstico de la esteatosis hepática por medio de otras técnicas menos agresivas, pero ninguna de ellas ha conseguido unos índices de sensibilidad y especificidad ni siquiera parecidos. La biopsia hepática es una prueba cruenta y con elevada morbilidad.

La mayoría de las veces, el diagnóstico de sospecha NAFLD se realiza de manera casual, mediante ecografía o mediante alteraciones analíticas en las transaminasas hepáticas. También de manera casual se puede llegar a un diagnóstico certero de NAFLD, tomando una biopsia ante un hallazgo operatorio de un hígado con características macroscópicas de esteatosis.

3.1.5.1. Métodos clínicos

La esteatosis es asintomática hasta que alcanza niveles muy avanzados. No suele dar síntomas hasta que el porcentaje de esteatosis hepática supera el 50% del volumen hepático.

Debemos sospecharla en^{38,64}:

- Pacientes obesos: aunque el índice de masa corporal total no lo podemos correlacionar cuantitativamente con el porcentaje de esteatosis⁶⁵.
- Diabetes tipo 2 y resistencia insulínica.
- Síndrome metabólico.
- Dislipemia.
- Síndrome de apnea obstructiva del sueño.
- Elevación crónica de AST y ALT sin causa evidente.

Al inicio produce síntomas muy inespecíficos como astenia, dolor en hipocondrio derecho o plenitud gástrica (30-40%). En casos más avanzados puede dar síntomas como la hepatomegalia blanda (55-85%). Una vez que la cirrosis se desarrolla, se

pueden identificar signos como ascitis, telangiectasias o arañas vasculares, esplenomegalia, eritema palmar, etc. (5-10%).

3.1.5.2. Exámenes de laboratorio

Existen diferentes parámetros bioquímicos de la función hepática y marcadores serológicos, que pueden establecer un diagnóstico de sospecha de esteatosis hepática. Incluso el uso de estos marcadores sanguíneos nos puede ayudar a diferenciar la esteatosis hepática alcohólica y la no alcohólica. En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas de puntuación o scores no invasivos diseñados para incrementar la detección de NAFLD, con poca adherencia de los profesionales en la práctica clínica.

A pesar de que la prevalencia de NAFLD y NASH es alta en la población general, no hay regímenes de detección aceptados en la población o screening poblacionales, ni si quiera en los pacientes con riesgo elevado.

Así pues disponemos de una serie de datos bioquímicos que nos pueden ayudar en el diagnóstico de NAFLD: parámetros de función hepática, marcadores serológicos y sistemas de puntuación no invasivos.

Parámetros de función hepática

- Elevación de transaminasas (aspartatoaminotransferasa o AST y alaninoaminotransferasa o ALT). La mayoría de los pacientes tienen una proporción AST/ALT <1. En estadios posteriores de la enfermedad, esta proporción puede revertirse, por lo que AST/ALT >1 no excluye NAFLD. Aunque los pacientes con NASH suelen tener una ALT elevada, el nivel de ALT casi normal no excluye NASH⁶⁶. Por lo tanto, ALT se considera un marcador poco sensible. Además no existe una correlación cuantitativa en las cifras de ALT y la severidad de la NAFLD. La obtención de ALT y AST aleatorias en pacientes con síndrome metabólico o diabetes puede ser razonable dada la alta

carga de morbilidad en esta población⁵³. El 50% de los pacientes con NAFLD tienen enzimas hepáticas normales y hasta el 80% de los pacientes con NASH pueden ser identificados en base a la elevación de transaminasas.

- Enzimas de colestasis (gammaglutiltransferasa o GGT y fosfatasa alcalina o FA): pueden estar ligeramente elevadas.
- Bilirrubina (B): permanece normal a menos que la enfermedad hepática sea avanzada.
- Hipoalbuminemia y trombocitopenia: indica la presencia de cirrosis o hipertensión portal y pueden ser los hallazgos de laboratorio primarios en pacientes con fibrosis avanzada.
- Sobrecarga férrica / heterocigotos gen HFE.

Marcadores serológicos

La citoqueratina-18 (CK18) es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto en las células hepáticas, considerada como un marcador de la apoptosis hepatocelular presente en la NAFLD^{67,68}. En un estudio inicial en HongKong⁶⁸ con diagnóstico de NAFLD probado por biopsia con 157 pacientes, el área bajo la curva ROC (AUROC) para CK18 fue de 0,90 para detectar la esteatosis (lo cual quiere decir que existe un 90% de probabilidad de que el diagnóstico realizado a un enfermo de esteatosis sea más correcto que el de una persona sana escogida al azar). Sin embargo un estudio grande muy reciente realizado en Estados Unidos⁶⁷ con 318 pacientes informó de un AUROC considerablemente menor (0,77). En una cohorte de Alemania⁶⁹ se observaron resultados similares.

El Factor de Crecimiento de Fibroblastos 21 (FGF21) está implicado en la regulación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos⁷⁰⁻⁷³. Los pacientes con esteatosis tienen niveles elevados de FGF21, que también se correlacionan con el grado de esteatosis⁷⁰⁻⁷³. En un estudio prospectivo reciente, los niveles de FGF21 predecían de manera independiente el desarrollo de esteatosis⁷¹. Sin embargo, en un estudio comparativo, la medición de los niveles de FGF21 fue menos preciso para diagnosticar la esteatosis que CK18⁷³.

Sistemas de puntuación

Se han desarrollado diferentes sistemas de puntuación con variables clínicas y de laboratorio para identificar a los pacientes NAFLD.

Índice de hígado graso (FLI) es el índice más prometedor, probablemente. Incorpora los siguientes parámetros: IMC, circunferencia de cintura y niveles séricos de TG y GGT. En un estudio realizado en la población general, este algoritmo tenía un AUROC de 0,84 para detectar la esteatosis⁷⁴.

Lipid Accumulation Product (LAP) es un algoritmo aún más simple que tiene en cuenta el sexo, la circunferencia de la cintura y los niveles de TG en ayunas. Sin embargo, en la misma población donde se desarrolló el FLI, LAP tuvo una menor AUROC para la identificación de esteatosis (0.79)⁷⁵.

Índice de esteatosis hepática: es otro algoritmo que incluye otro grupo de biomarcadores como el sexo, la historia de DM tipo II, el IMC, ALT, AST. Su AUROC para diagnosticar esteatosis fue de 0,81, definiendo la presencia de hígado graso mediante ultrasonidos⁷⁶.

SteatoTest: incluye niveles de α -2 macroglobulina, apolipoproteína A-1, haptoglobina, B total, GGT, glucosa en ayunas, TG, colesterol y ALT ajustados por edad, sexo e IMC. Además del coste económico que supone realizar este test, su sensibilidad y su especificidad son bastante limitadas (69% y 74% respectivamente)⁷⁷.

En resumen, entre los marcadores serológicos que han sido evaluados para la detección de esteatosis, la medición de los niveles de CK18 y el FLI parecen ser más exactos.

Existen también una serie de scores que combinan diferentes parámetros para distinguir NASH de NAFLD.

BARD score tiene en cuenta el IMC, la relación AST/ALT y la presencia de DM tipo 2. Tiene un valor predictivo alto para excluir la fibrosis (estadío 3-4) en una población de pacientes obesos de Estados Unidos⁷⁸. Esta puntuación fue validada en una población polaca, donde mostró niveles similares, con un valor predictivo negativo (VPN) de 97%⁷⁹.

NAFLD fibrosis score es otro sistema de puntuación que valora la edad, el IMC, la hiperglucemia en ayuno, el recuento de plaquetas, la albúmina y la relación AST/ALT. Tiene un AUROC de 0,82 para detectar fibrosis avanzada en un estudio realizado en Estados Unidos (N=733)⁸⁰. En otro estudio con 162 pacientes con NAFLD, este score tuvo un VPN de 91% y evitó la necesidad de un 79% de biopsias.

Fibrosis-4 score (FIB-4) parece ser el sistema de puntuación más prometedor para distinguir NAFLD de NASH. Incorpora la edad, AST, ALT y plaquetas. En un estudio comparativo en Reino Unido (N=145), el FIB-4 tuvo una AUROC para detectar la fibrosis avanzada en comparación con AST/ALT, NAFLD fibrosis score, BARD y APRI de 0.86, 0.83, 0.81, 0.77 y 0.67 respectivamente⁸¹.

Otros Scores que se han desarrollado para el diagnóstico diferencial de NASH y esteatosis que se han estudiado de manera menos extensa son: FibroMeter NAFLD, KOELN-Essen index, NAFLD liver fat score, NASH score, FibroTest-FibroSURE, NashTest, etc.

En resumen, se han desarrollado un gran número de algoritmos para el diagnóstico diferencial de esteatosis y NASH. Entre los algoritmos existentes, el FIB-4 parece ser el más preciso. Además este algoritmo ha sido validado en varios estudios y comprende variables fácilmente disponibles y de bajo costo. Algoritmos más elaborados y costosos parecen ser menos exactos que FIB-4.

3.1.5.3. Métodos radiológicos

Ecografía

La ultrasonografía es un método diagnóstico accesible, barato e inocuo para evaluar la presencia de esteatosis. Tiene dos inconvenientes, el primero es que se trata de una exploración observador dependiente, con una gran variabilidad entre observadores y el segundo es que no aporta datos sobre la fibrosis.

La infiltración grasa hepática aumenta la ecogenicidad, aumentando la interfase entre las gotas de grasa y los hepatocitos⁸². Este aumento de ecogenicidad se produce fundamentalmente en la esteatosis macrovesicular. Los grados ecográficos de hígado graso se relacionan con el grado de acumulación grasa macrovesicular, no así la acumulación microvesicular.

Los cambios ecográficos que se observan en el hígado con infiltración grasa suelen ser aparentes a partir de una esteatosis del 15-20%, y son los siguientes⁸²:

- Hepatomegalia.
- Hiperecogenicidad del parénquima hepático.
- Atenuación ecográfica en las áreas capsulares.
- Mala visualización de las paredes de la vesícula biliar, venas suprahepáticas y diafragma.
- Dilatación aparente de venas portales y conductos biliares.
- Diferencia hepatorrenal o diferencia en la ecogenicidad existente entre el hígado y la corteza del riñón derecho (Fig.8).
- Borrosidad de la vena hepática y de la vena porta.



Fig.8. Ecografía hepática: Hígado con ecos refringentes, comparados con el riñón.

La diferencia hepatorrenal o la visión borrosa de la vena hepática tiene una sensibilidad similar a la hiperecogenicidad para el diagnóstico ecográfico de esteatosis. Sin embargo, otras características como la visión borrosa de la vena porta, tiene menor sensibilidad para el diagnóstico de esteatosis que la hiperecogenicidad⁸².

En un estudio reciente en 79 pacientes de Estados Unidos (21 pacientes con NAFLD) que se sometieron a ecografía hepática y a biopsia hepática, la sensibilidad (S) y la especificidad (E) de la ecografía para detectar la esteatosis macrovesicular mayor del 5% fue de 82 y 100% respectivamente. En pacientes con esteatosis macrovesicular > 20% la S se incrementó hasta el 96% y la E bajó a un 98%. Sin embargo, la S y la E para detectar la esteatosis microvesicular fue solo del 59 y 74% respectivamente⁸². En pacientes con esteatosis microvesicular > 20% la S sólo aumentó hasta un 67% y la E bajó hasta un 66%⁸².

En un estudio de 94 pacientes con NAFLD, el AUROC de la ecografía como método diagnóstico de esteatosis hepática fue de 0.98. La S y la E en este estudio fue del 92 y 100% respectivamente⁸³.

En un metaanálisis de 49 estudios (N=4720), el AUROC para la ecografía fue de 0.93 para la detección de esteatosis, con una sensibilidad y especificidad del 85 y 94% respectivamente⁸⁴.

El diagnóstico ultrasonográfico de la esteatosis hepática es cualitativo, distinguiendo tres grados ecográficos de esteatosis:

- Grado 1 o depósito leve: menos de 33% de esteatosis. Se observa un hígado hipoecogénico con un leve incremento de los ecos finos y buena visualización de los vasos intrahepáticos y del diafragma.
- Grado 2 o depósito moderado: esteatosis entre 33-66%. Se observa un incremento moderado de los ecos finos con cierta dificultad en la visualización de los vasos intrahepáticos y el diafragma (Fig.9).



Fig.9. Ecografía hepática de un hígado con grado 2 de esteatosis.

- Grado 3 o depósito severo: esteatosis mayor de 66%. Se observa un marcado incremento de los ecos finos intraparenquimatosos con ausencia de visualización de los vasos intraparenquimatosos o del diafragma (Fig.10).



Fig. 10. Ecografía hepática de un hígado con esteatosis grado 3.

Los patrones de acumulación de grasa en el hígado pueden adquirir distintas formas⁸⁵:

- Patrón difuso: distribución homogénea de la esteatosis en toda la víscera. Es el más frecuente.
- Patrón focal: focos de esteatosis sobre un fondo de tejido hepático normal. Es el segundo más frecuente. Los depósitos pueden ser escasos o multifocales. La acumulación suele ser subcapsular (lo más frecuente) o perivascular. Puede llevar a un diagnóstico erróneo de metástasis hepática.
- Patrón difuso con parches sanos: focos de tejido hepático sano inmersos en un fondo de parénquima esteatósico.
- Patrón multifocal: acúmulo de múltiples focos diseminados a lo largo del parénquima en localizaciones al azar, son fácilmente confundibles también con metástasis hepática.

Tomografía computarizada (TC)

La TC con contraste proporciona una evaluación objetiva de la presencia de esteatosis, aunque se trata de un método diagnóstico más caro que la ecografía y expone al paciente a radiación.

Se basa en que la atenuación normal del bazo es 8-10 HU (Unidades Hounsfield) menos que el hígado, lo que permite contrastar las densidades de las dos vísceras⁸⁴. Si observamos una atenuación más baja que el bazo esto indica una infiltración grasa del hígado o esteatosis (Fig.11).



Fig.11. TC hepático con contraste donde se aprecia la diferencia de atenuación entre el hígado y bazo.

Es importante resaltar que el TC sin contraste no es capaz de apreciar los cambios esteatósicos, ya que no se puede apreciar la diferencia de densidad del hígado con respecto al bazo (Fig.12).

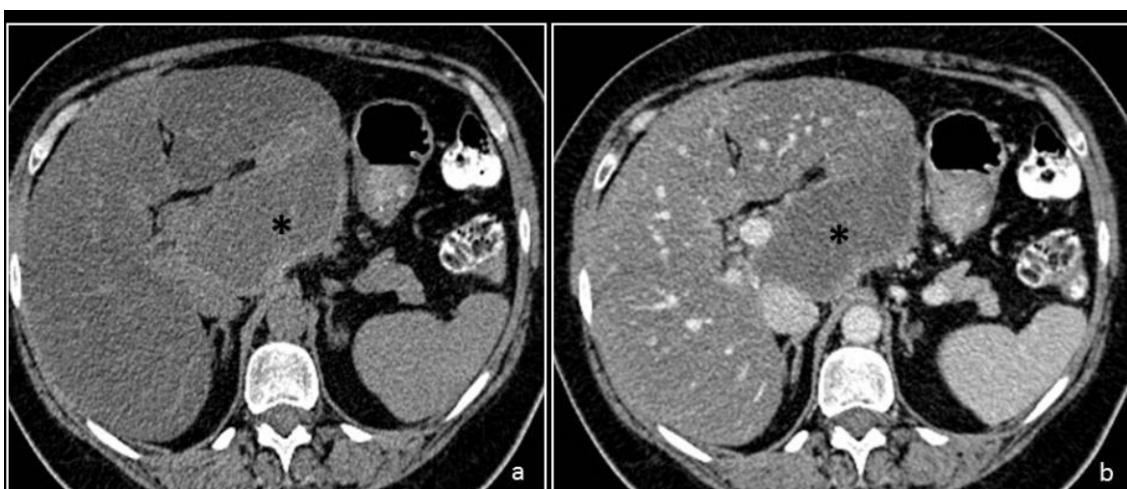


Fig.12. A la izda TC sin contraste donde no se puede discernir entre la densidad del hígado con respecto al bazo. A la dcha, sin embargo, la administración de contraste intravenoso permite apreciar esta diferencia.

Otra limitación de la TC como método diagnóstico de esteatosis hepática es que se necesitan grados de infiltración grasa elevados para apreciar esta diferencia de contraste entre el hígado y el bazo. En un estudio comparativo, la TC fue menos precisa que la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y espectroscopia de RMN (MRS) para identificar la esteatosis $> 5\%$, mientras que estos dos últimos métodos tuvieron una precisión similar (AUROC 0.65, 0.88 y 0.85 respectivamente)⁸⁶. Notablemente, en grados más altos de esteatosis ($>30\%$) la precisión de los 3 métodos fue similar (AUROC 0.92, 0.99 y 0.91 respectivamente)⁸⁶.

Hay autores que evalúan la L/S ratio (ratio de atenuación entre hígado y bazo) y el punto de corte que aconsejan para excluir a aquellos pacientes con más que moderada esteatosis sería 1.1⁸⁷.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La RMN tiene una precisión excelente para el diagnóstico de esteatosis, que es similar a la precisión obtenida por espectroscopia de RMN (MRS) y superior a la de la ecografía o la TC. Además tiene la ventaja de que es un método no invasivo, que no utiliza radiación, y que permite medir el grado de infiltración grasa, incluso en esteatosis $< 3\%$ ⁸³. El inconveniente de esta técnica, es que se trata de un método de diagnóstico caro, y que no permite diferenciar la presencia de fibrosis ni diferenciar NAFLD de NASH⁸⁸. La sensibilidad y especificidad para la detección de esteatosis hepática $> 5\%$ es de 76-90% y 87-91% respectivamente.

Mediante RMN podemos evaluar diversos aspectos de la anatomía hepática⁸⁹:

- Grado de esteatosis hepática: clasifica los grados de acumulación de la grasa en la víscera hepática en:
 - Esteatosis leve: intensidad de señal del hígado mayor que la del músculo paravertebral y más baja que la del bazo.
 - Esteatosis media: intensidad de señal del hígado mayor o igual que la del músculo paravertebral y bazo.

- Esteatosis moderada-grave: intensidad de señal del hígado más baja que la del músculo paravertebral y del bazo (Fig.13).
- Presencia de anomalías focales o difusas.
- Estimación volumétrica del hígado.
- Información sobre variaciones anatómicas.

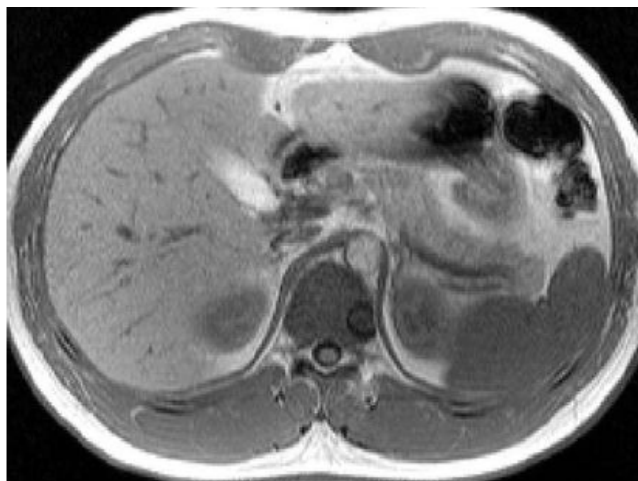


Fig. 13. Imagen de RMN que muestra esteatosis severa (intensidad de señal del hígado más baja que músculo paravertebral y bazo).

Los fallos de la RM se producen por: la infiltración grasa del músculo, el edema muscular, la fibrosis y la incorrecta elección de la región a comparar y evaluar.

Espectroscopia de RMN (MRS)

La MRS es uno de los métodos más precisos para el diagnóstico de esteatosis⁹⁰. Aporta información sobre la composición química del hígado sano y del hígado graso, siendo útil en el seguimiento de la respuesta al tratamiento de pacientes con trastornos metabólicos como la obesidad así como para el diagnóstico prequirúrgico en el trasplante⁹¹. Se trata de una prueba observador-independiente, además requiere experiencia por parte del radiólogo para interpretar los resultados. Se trata de una prueba rápida⁹². Sin embargo esta prueba tiene desventajas importantes, como la disponibilidad limitada y el alto coste. Algunos estudios han demostrado que un estado de fibrosis avanzada puede interferir en la precisión de esta prueba⁹¹. Algunos estudios, incluidos un metaanálisis de 2011 concluyen que la MRS es el método no invasivo más preciso para el diagnóstico de esteatosis hepática⁸³.

Elastografía

Los métodos diagnósticos descritos hasta ahora nos permiten realizar un diagnóstico de infiltración grasa del hígado, pero no diferencian estadios más avanzados de inflamación crónica o fibrosis. La elastografía es un método diagnóstico no invasivo que nos permite diferenciar la esteatosis hepática de la esteatohepatitis y de cirrosis. Este estudio se realiza utilizando ecografía o RMN. El método ecográfico más empleado es la ecografía de transición o Fibroscan⁹³. Dispone de una sonda emisora-receptora que emite dos tipos de ondas: una onda pulsátil vibratoria que penetra en el tejido hepático y una onda de ultrasonidos que capta la velocidad a la que se propaga la primera onda. El transductor se coloca sobre el lóbulo derecho del hígado a través de un espacio intercostal y produce una vibración que genera una onda, que se transmite hasta el hígado. La velocidad de la onda se correlaciona directamente con la rigidez hepática. La máquina procesa la información y genera en una pantalla de vídeo una imagen correspondiente a la onda elástica con un valor de rigidez hepática medido en kilopascales (kPa). Si la onda vibratoria viaja lentamente quiere decir que el tejido del hígado es elástico, si la onda viaja rápido quiere decir que el hígado es poco elástico o existe fibrosis, por lo que el valor final es alto. Los valores de elasticidad que puede detectar el Fibroscan están comprendidos entre 2,5 y 75 kPa. Una persona sana obtiene un valor en torno a 5,5 kPa⁹⁴.

Mediante esta técnica podemos diferenciar 4 grados de enfermedad hepática siendo F0 ausencia de fibrosis y F4 cirrosis hepática⁹⁵.

En un gran estudio con 246 pacientes diagnosticados de NAFLD, elastografía tuvo una AUROC de 0.84 y de 0.93 para la detección de la fibrosis significativa y severa respectivamente⁹⁶.

Esta prueba tiene limitaciones y es menos precisa para los pacientes con obesidad. La obesidad no sólo obstaculiza la medición de la rigidez hepática, sino que aumenta la rigidez hepática independientemente de la presencia de cirrosis. Para superar esta limitación en pacientes obesos, se ha desarrollado la sonda XL, que genera una frecuencia y amplitud de onda mayor. La vibración es de mayor profundidad⁹⁷.

3.1.5.4. Biopsia hepática. Análisis histológico

Biopsia hepática

Actualmente, la biopsia hepática se considera el *gold standard* del diagnóstico de la esteatosis hepática, aunque supone una prueba cruenta no exenta de riesgos. La alta prevalencia de NAFLD en la población y las limitaciones, riesgos y costes de la biopsia hepática, han llevado a los investigadores a buscar métodos no invasivos para diagnosticar y establecer una etapa evolutiva de esta enfermedad. La técnica ideal sería inocua, barata, reproducible, capaz de diagnosticar el espectro completo de NAFLD (desde cambios inflamatorios crónicos hasta cirrosis) y que permita realizar un seguimiento con la intención de ver los cambios generados por el tratamiento. Diferentes métodos incluyendo marcadores séricos y pruebas de imagen se han investigado recientemente y aunque se han realizado importantes avances en estos campos, aunque ninguno de ellos ha podido reemplazar a la biopsia hepática como prueba diagnóstica de certeza de la esteatosis hepática⁸³.

Indicaciones

Las indicaciones generales para realizar una biopsia hepática en pacientes con sospecha de NAFLD son: confirmar o excluir el diagnóstico, diagnosticar otras enfermedades hepáticas y determinar el grado de daño hepático para iniciar tratamiento y establecer un pronóstico. Recientemente se han publicado unas indicaciones más específicas. De acuerdo con las directrices de la Asociación Americana para el Estudio de la Enfermedad Hepática (AASLD): la biopsia hepática debe reservarse para los sujetos que pueden obtener un beneficio del diagnóstico certero, como los pacientes con diagnósticos potencialmente curables, para los niños con diagnóstico poco claro o para los sujetos a los que se esté considerando un tratamiento³⁸. La Asociación Europea para el estudio de la Enfermedad Hepática recomienda biopsia hepática en todos los sujetos sometidos a cirugía bariátrica⁹⁸. No obstante, la realización de una biopsia hepática a los pacientes con sospecha de NAFLD sigue siendo un tema polémico en la práctica clínica.

Hay estudios que apoyan el valor de la biopsia hepática. Skelly⁹⁹ mostró que de 354 pacientes biopsiados, con alteraciones en las pruebas de función o de imagen hepática, el 66% tenía hígado graso (50% de ellos tenían esteatohepatitis) y el 19% tenían otras causas tratables de hepatitis incluyendo hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, hemocromatosis o enfermedad hepática alcohólica. Un estudio más reciente de Gaidos¹⁰⁰ demostró un beneficio a largo plazo de supervivencia en pacientes con NAFLD que se habían sometido a biopsia hepática precoz.

Limitaciones

La principal limitación de la biopsia hepática, es que se considera un procedimiento cruento e invasivo. Las potenciales complicaciones que pueden ocurrir aún en condiciones ideales son el dolor, el sangrado menor y mayor (0,3%), la perforación de órganos (en casos de biopsia a ciegas) y la muerte (se ha notificado en el 0.01%)^{101,102}. Actualmente, la mayoría de las biopsias hepáticas se realizan guiadas por ultrasonidos, por lo tanto es dependiente de la experiencia del radiólogo que la realiza, siendo la experiencia un factor importante de éxito.

El tamaño de la biopsia debe ser de al menos 1.6 cms de longitud con 1.2-1.8 mm de diámetro, lo cual representa aproximadamente 1: 50000 del órgano entero. Otra limitación supone la diferente distribución de la esteatosis y de la fibrosis dentro del hígado. Por ejemplo el tejido hepático subcapsular generalmente es más fibrótico y el lóbulo hepático izquierdo tiene zonas portales más amplias cerca de la cápsula que el lóbulo derecho. Por lo tanto, es importante que las biopsias se realicen de manera similar y en la misma región del hígado¹⁰³.

La experiencia del patólogo también juega un papel importante en el diagnóstico de NAFLD. Kleiner¹⁰⁴ realizó un estudio sobre 32 biopsias de adultos examinadas por 9 patólogos. No se observaron diferencias interobservador en la cuantificación de esteatosis y de la fibrosis, pero sí hubo diferencias en cuanto al diagnóstico de la inflamación crónica y la localización de la esteatosis. Otros estudios similares tuvieron las mismas conclusiones¹⁰⁵.

Métodos de tinción de la biopsia hepática

La tinción más habitual para el estudio de la esteatosis en biopsia hepática es la tinción de hematoxilina-eosina (HE). Existen otros métodos de tinción como el tricrómico de Masson (TM), que permite apreciar mejor las zonas de fibrosis hepática (Fig.14); la tinción de Van Gieson (Fig.15) y la tinción con rojo Sudán, que tiñe la grasa de color rojo (Fig.16).

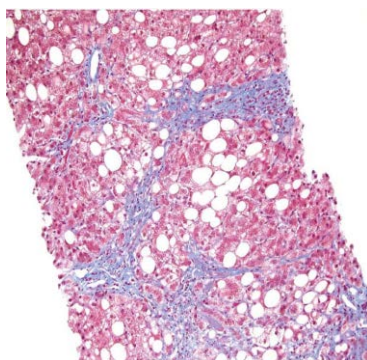


Fig. 14. Tricrómico de Masson 200x: las zonas de fibrosis hepática se observan de color azul.

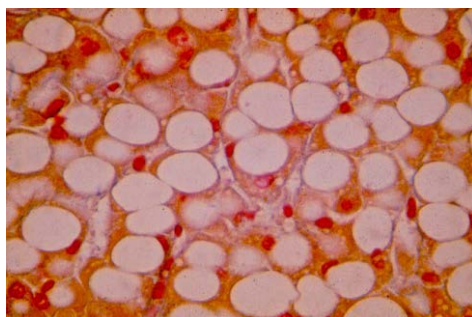


Fig.15. Tinción de Van Gieson.

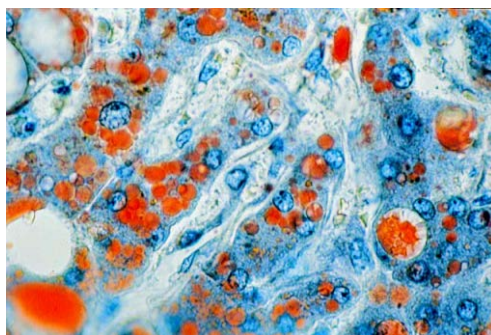


Fig. 16. Tinción de rojo Sudán: se observa la grasa de color rojo.

En el hígado esteatósico podemos encontrar los siguientes signos histológicos: presencia de granulomas (Fig.17) y cuerpos acidófilos, degeneración hialina de Mallory en el citoplasma (Fig.18), presencia de megamitocondrias y aumento de la concentración intrahepática de hierro.

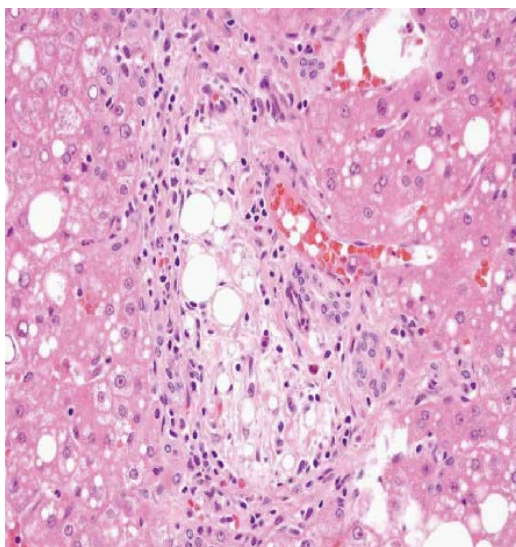


Fig.17. Lipogranuloma portal (HE 400x).

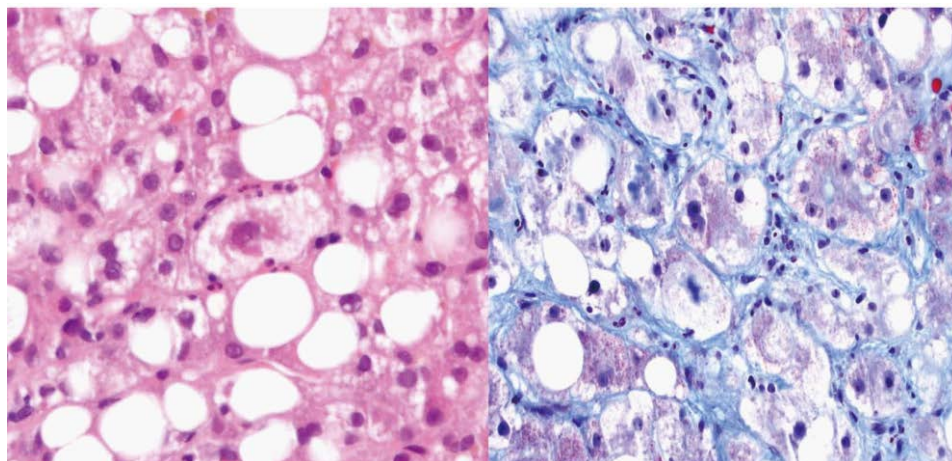


Fig. 18. A la izquierda cuerpos de Mallory (HE 600x). A la derecha cuerpos de Mallory (TM 600x).

Medición de la esteatosis hepática y clasificación anatómo-patológica

Histológicamente, la valoración de la esteatosis hepática se realiza primero de un modo cualitativo en el que se valora la distribución en el lóbulo hepático y el tipo de esteatosis. La localización de la esteatosis inicialmente suele ser centrolobulillar, quiere decir en torno a la vena centrolobulillar (Fig.19). Es menos frecuente observar una distribución de la esteatosis en torno a los espacios porta o periportal (Fig.20). Cuando la esteatosis está muy establecida suele ser panacinar¹⁰⁶ (Fig.21). En período de resolución, la esteatosis suele ser irregular o azonal.

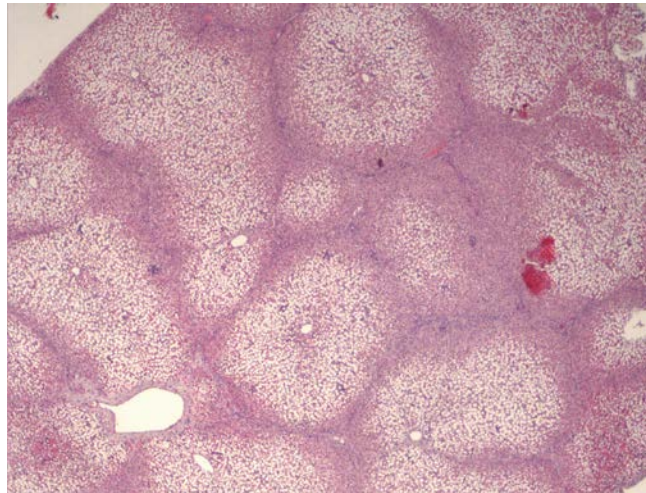


Fig.19. Esteatosis centrolobulillar. Se observa la disposición de los hepatocitos con degeneración grasa en torno a la vena centrolobulillar.

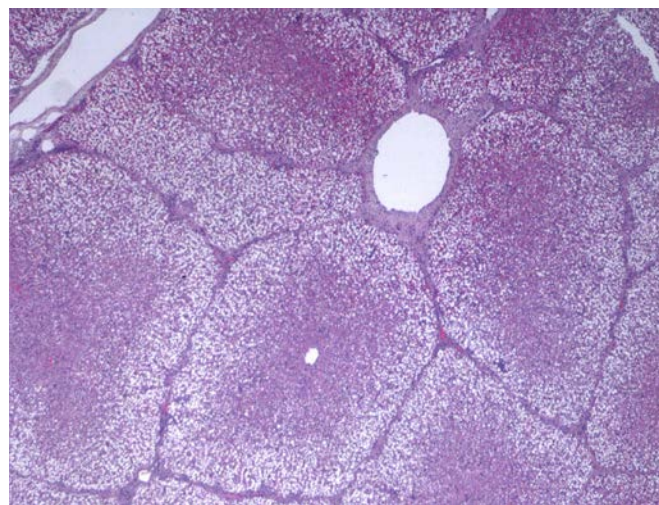


Fig.20. Esteatosis periportal. Se observa la disposición de los hepatocitos con degeneración grasa distribuidos en la periferia del lobulillo hepático.

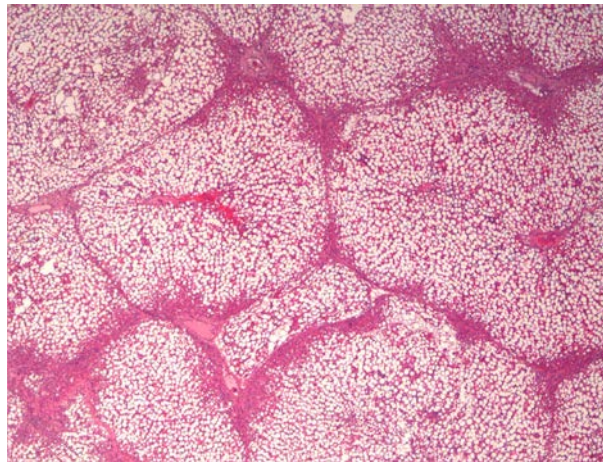


Fig.21. *Esteatosis panacinar*

El análisis histológico puede mostrar 2 tipos de esteatosis:

- Esteatosis microvesicular: cuando el citoplasma de los hepatocitos contiene muchas y pequeñas inclusiones grasas permaneciendo el núcleo en el centro de la célula (Fig. 22). La esteatosis microvesicular puede tener una distribución irregular hasta en un 10% de NASH, y se ha demostrado en un estudio que está asociado a los hepatocitos en globo y a la fibrosis avanzada.

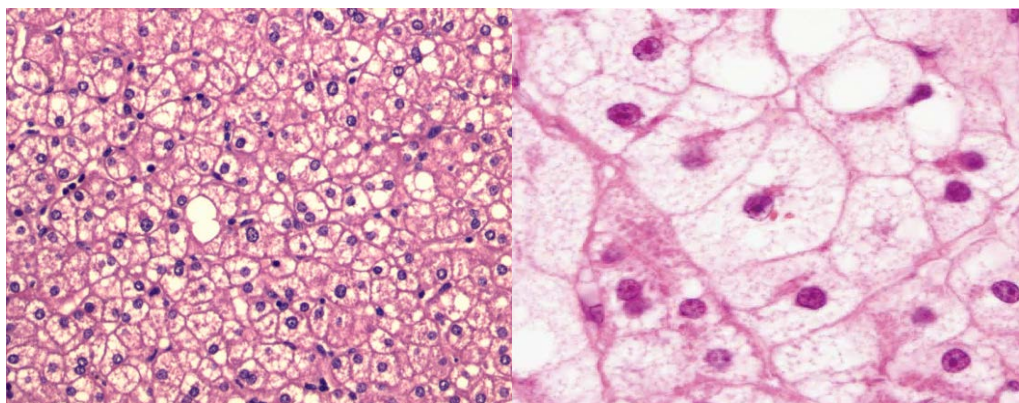


Fig.22. *Esteatosis microvesicular: citoplasma de los hepatocitos ocupado por pequeñas gotas de grasa.*

- Esteatosis macrovesicular: cuando el citoplasma de los hepatocitos contiene una larga vacuola grasa que desplaza el núcleo a la periferia. Pequeñas gotas de lípidos a menudo forman gotitas alrededor de las gotas más grandes y al final convergen en una macrogótula. Aunque en esta forma de esteatosis se pueden observar pequeñas gotas, no se debe confundir con la esteatosis microvesicular.

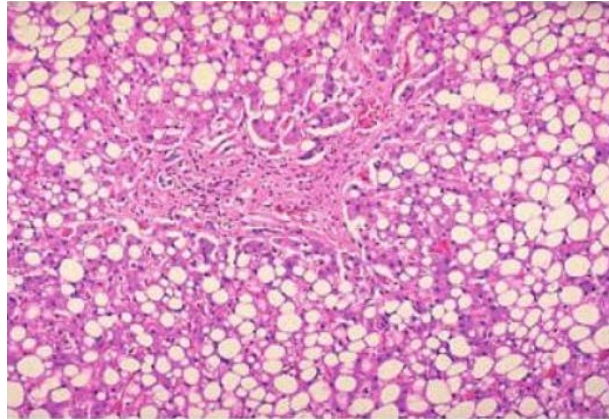


Fig.23. Esteatosis macrovesicular: se observan hepatocitos esteatósicos (macrovesículas) en todo el campo

En segundo lugar se realiza el análisis cuantitativo de la pieza o la estimación del porcentaje de hepatocitos afectados por vacuolas grasas. La cuantificación de la esteatosis se realiza valorando el porcentaje de hepatocitos que presentan vacuolas de lípidos en relación al total de hepatocitos en una muestra hepática teñida con HE, expresándose en %. Esta valoración, aunque totalmente subjetiva por parte del patólogo, está muy extendida en la mayoría de laboratorios.

La cantidad de hepatocitos afectados visualizados en la biopsia hepática permite realizar una clasificación histopatológica:

- Normal (<5 % de los hepatocitos del tejido examinado).
- Leve (< 30 % de los hepatocitos del tejido examinado).
- Moderada (30-59% de los hepatocitos del tejido examinado).
- Grave (>60% de los hepatocitos del tejido examinado).

Sin embargo existen diferentes métodos de análisis cuantitativo¹⁰⁷:

- Cuantificación directa: cantidad de lípidos en una muestra de tejido hepático. Los lípidos son extraídos de la muestra por disolución y son cuantificados expresándose las cifras por miligramo de tejido hepático. Aunque se trata el método más fidedigno, no es utilizado en la práctica clínica habitual.
- Semicuantitativo¹⁰⁸: el patólogo estima el área de la biopsia que está ocupada por grasa, expresando el resultado en porcentaje. Este método es rápido y sencillo, pero limitado por la subjetividad del patólogo. Varía según las escalas de graduación y no se presenta como una variable continua, lo que dificulta la comparación entre estudios. Para ello se han intentado diseñar los programas informáticos y lectores ópticos automáticos que permiten medir la esteatosis como variable continua y reducir la variabilidad interobservador.
- Cuantificación mediante análisis asistido por ordenador¹⁰⁹. Con el empleo de programas informáticos y lectores ópticos automáticos que calculan el porcentaje medido en varios campos. Recientemente se están desarrollando procedimientos automáticos computerizados utilizando diferentes software comercializados para el análisis digital de las imágenes histológicas. Estos sistemas evitan la valoración subjetiva del patólogo, ya que el programa de imagen es capaz de discernir el área de tejido realmente ocupada por los lípidos.

Medición de la esteatohepatitis

Hay una constelación de lesiones histopatológicas necesarias para el diagnóstico de esteatohepatitis. Éstas incluyen:

- Presencia de esteatosis
- Inflamación (lobulillar y portal). La inflamación lobulillar es más frecuente que la inflamación portal en NAFLD del adulto no complicado. Es principalmente mononuclear, pero también incluye células de Kupffer, microgranulomas y lipogranulomas.

- Degeneración baloniforme de los hepatocitos o hepatocitos en globo: aparecen como hepatocitos agrandados con una apariencia floculada y despejada del citoplasma, con bordes citoplasmáticos irregulares. A menudo su núcleo es hipercromático (Fig.24). La balonización de hepatocitos se ha demostrado que se correlaciona con el daño oxidativo y la pérdida de la estructura normal del citoesqueleto. Los hepatocitos balonizados son más frecuentes en la zona central del lobulillo.

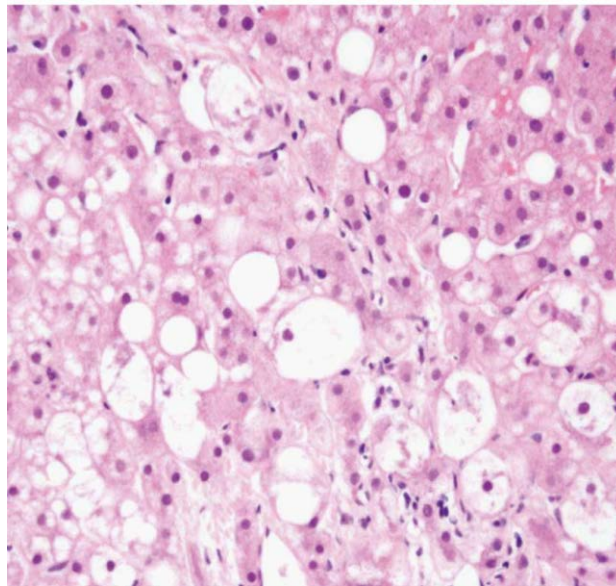


Fig.24. *Hepatocitos balonizados (HE 600x).*

El estudio de la esteatohepatitis se basa en la clasificación propuesta por Brunt et al de la actividad necroinflamatoria y de la fibrosis¹¹⁰

Actividad necroinflamatoria:

- Grado I
 - Esteatosis > 66%
 - Balonización de los hepatocitos en la zona 3 de forma ocasional
 - Inflamación intralobular: infiltrados de PMN y/o linfocitos
 - Nula o escasa inflamación portal

- Grado II
 - Cualquier grado de esteatosis
 - Balonización de los hepatocitos obvia, predominantemente en la zona 3
 - Inflamación intralobular: PMN e inflamación crónica.
 - Inflamación portal leve o moderada
- Grado III
 - Esteatosis panacinar
 - Balonización y desorden evidente, predominante en zona 3
 - Inflamación intralobular: PMN e inflamación crónica.
 - Inflamación portal leve o moderada
- Grado III
 - Esteatosis panacinar
 - Balonización y desorden evidente, predominante en zona 3
 - Inflamación intralobular: PMN e inflamación crónica
 - Inflamación portal moderada

Grados de fibrosis:

- Grado 1: fibrosis perisinusoidal
- Grado 2: fibrosis perisinusoidal y fibrosis periportal
- Grado 3: estadio 2 y puentes de fibrosis (Fig.25)
- Grado 4: cirrosis

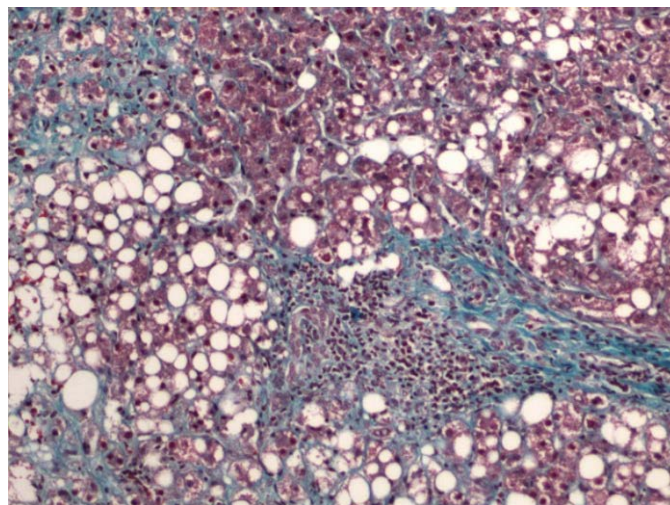


Fig.25. Esteatosis macro y microvesicular con arquitectura desestructurada con importante fibrosis periportal y perisinusoidal (TM 10x).

3.1.6. TRATAMIENTO

El objetivo del tratamiento de la esteatosis hepática consiste en mejorar la infiltración grasa del hígado y prevenir la fibrosis. El tratamiento de la esteatosis hepática una vez instaurada se consigue fundamentalmente mediante restricciones dietéticas y cambios en el estilo de vida. Se han utilizado también los fármacos empleados en el tratamiento del síndrome metabólico (antidiabéticos, estatinas...). Recientemente se ha demostrado la eficacia de diversos agentes antioxidantes en el tratamiento de la esteatosis hepática, como la Vitamina E y la melatonina. No existe hoy en día un tratamiento específico, inocuo y eficaz para tratar la esteatosis hepática.

3.1.6.1. Cambios en el estilo de vida

Se ha demostrado que la *pérdida de peso* de un 5-10% mejora la resistencia insulínica, los niveles de enzimas hepáticas y el daño histológico hepático. La mejor evidencia de ello, se encuentra en un estudio controlado y aleatorizado llevado a cabo por Promrat et al.¹¹¹ en 31 pacientes obesos con NASH. En este ensayo se demostró que aquellos pacientes que consiguieron una pérdida de peso mayor al 7% mediante dieta y actividad física tuvieron una mejoría de la esteatosis hepática a nivel histológico (disminución del grado de esteatosis, necrosis e inflamación, disminución de la balonización de los hepatocitos y del NAFLD Activity Score).

Todavía no hay suficiente evidencia que demuestre qué tipo de *dieta* específica debe seguirse para lograr el mejor resultado. La dieta mediterránea parece ser la mejor opción para el tratamiento de NAFLD/NASH¹¹². La dieta mediterránea se caracteriza por la abundancia de alimentos vegetales y cereales, como verduras verdes y amarillas, ensaladas, legumbres, pan, pastas, frutas y nueces. El aceite de oliva es la principal fuente de grasa y la ingesta de pescado, aves, productos lácteos y huevos es moderada. Además se consumen diferentes cantidades de vino durante las comidas. Las grasas animales utilizadas en mantequilla, crema y manteca de cerdo no están incluidas en esta dieta¹¹³. Un estudio en una población resistente a la insulina con NAFLD mostró que

incluso sin pérdida de peso, la dieta mediterránea reduce la esteatosis hepática y mejora la sensibilidad a la insulina¹¹⁴. Recientes revisiones sistemáticas y metaanálisis demuestran que la adhesión o la adopción de un régimen dietético mediterráneo presenta un efecto beneficioso sobre la prevención y la resolución del síndrome metabólico, así como sobre los parámetros metabólicos individuales^{112,115}. Además la reducción de la fructosa en la dieta puede ser beneficiosa. La ingesta diaria de fructosa se asocia con una reducción de la esteatosis hepática, pero aumenta la fibrosis, y en los adultos mayores se asocia con infiltración inflamatoria hepática y balonización de los hepatocitos^{116,117}. Malaguarnera et al.¹¹⁸ demostraron que algunos probióticos tienen efectos beneficiosos como complementos terapéuticos en los pacientes con NAFLD. Sus resultados mostraron que, comparado con la modificación del estilo de vida sola, *Bifidobacterium longum* junto con oligosacáridos de fructosa y modificación del estilo de vida condujeron a reducciones significativamente mayores en la esteatosis y el índice de actividad de la NASH. Curiosamente, los efectos metabólicos del consumo de café también han atraído gran interés. Algunos datos preliminares sugieren que el consumo de café está asociado con la mejora de la NASH. Sin embargo, el mecanismo exacto de estos efectos beneficiosos aún no se conoce y se necesitan más estudios¹¹⁹.

Se ha demostrado que la realización de actividad física, independientemente de la pérdida de peso, reduce la esteatosis hepática¹²⁰. Hallsworth et al.¹²¹ realizaron un estudio en pacientes con NAFLD sobre el efecto del ejercicio físico en los niveles serológicos de lípidos. La realización de ejercicio físico aeróbico durante 8 semanas (3 veces por semana durante 45-60 minutos) redujo los niveles sanguíneos de lípidos, redujo la oxidación lipídica y mejoró la resistencia insulínica. Una revisión realizada por Thoma et al.¹²² analizaron 23 estudios utilizando la modificación de la dieta, la actividad física o una combinación de ambas. Encontraron que las modificaciones de estilo de vida que condujeron a la reducción de peso y/o aumento de la actividad física, reducía la grasa hepática y la resistencia insulínica. En resumen, los cambios en el estilo de vida que conducen a una pérdida de peso o a un incremento de la actividad física, reducen los niveles de enzimas hepáticas, mejoran la histología hepática, mejoran la resistencia insulínica y la peroxidación lipídica¹²⁰. La pérdida de al menos 3-5% del peso corporal parece mejorar la esteatosis, pero una mayor pérdida de peso de hasta el

10% puede mejorar la actividad inflamatoria¹¹¹. El ejercicio solo en adultos con NAFLD puede reducir la esteatosis, pero su capacidad para mejorar otros aspectos de la histología hepática sigue siendo desconocido¹²³.

3.1.6.2. Tratamiento farmacológico

Las intervenciones farmacológicas para los pacientes con NAFLD/NASH están dirigidas a tratar los componentes subyacentes del síndrome metabólico (obesidad, diabetes, HTA, dislipemia), así como la disfunción hepática misma¹²⁴. Muchos estudios clínicos han investigado numerosos fármacos y suplementos, que suponen una terapia segura y eficaz que puede ser recomendada para el tratamiento de NASH. Los individuos con NAFLD/NASH muestran heterogeneidad de las vías patogénicas, lo que requiere un tratamiento individualizado de acuerdo con la patogénesis subyacente.

Fármacos antidiabéticos

La resistencia insulínica es un mecanismo importante en el desarrollo y en la progresión de NAFLD. Por lo tanto, diversas líneas de investigación se han centrado en el efecto terapéutico potencial de los fármacos antidiabéticos en NAFLD/NASH. En particular, la metformina y las tiazolidinedionas (TZD) han sido investigadas intensivamente en términos de mejorar la resistencia insulínica en los pacientes con NAFLD/NASH.

La metformina mejora la resistencia insulínica a través de la reducción de la gluconeogénesis hepática, la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos, aumento de la sensibilidad periférica insulínica, disminución de la absorción intestinal de glucosa y disminución de la concentración de lípidos séricos. Los primeros estudios piloto sobre la metformina en pacientes con NAFLD/NASH mostraron resultados prometedores en términos de mejora de la enfermedad hepática grasa y los niveles de aminotransferasa¹²⁵. Sin embargo en un ensayo controlado aleatorio más grande, la metformina fracasó como opción de tratamiento comparada con placebo en pacientes con NAFLD/NASH¹²⁶. Por lo tanto no hay evidencia que recomiende el uso de la metformina como terapia para NAFLD/NASH¹¹².

TZDs aumentan la disponibilidad de la insulina y reducen la producción de glucosa hepática mediante la unión al peroxisoma proliferador activado por el receptor γ (PPAR- γ). En un estudio amplio, la pioglitazona indujo mejoría aguda del tejido adiposo, asociándose a cambios en la histología hepática, incluida la fibrosis¹²⁷. El tratamiento con pioglitazona también se asocia con niveles plasmáticos aumentados de adiponectina, una adipocina que a menudo disminuye en pacientes con NAFLD¹²⁸. El uso de pioglitazona también está asociado con algunos efectos secundarios que incluyen el aumento de peso, el edema, la insuficiencia cardíaca y la reducción de la densidad ósea. El uso de pioglitazona por más de dos años conlleva un mayor riesgo de cáncer de vejiga¹²⁹.

La rosiglitazona es un fármaco ampliamente utilizado para tratar a pacientes con DM tipo 2. Su seguridad en términos de morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares ha sido cuestionada. El uso de rosiglitazona está prohibido en Europa de acuerdo con las recomendaciones de la Agencia Europea del Medicamento, y su uso está muy restringido en los Estados Unidos. Sin embargo, los últimos datos muestran que el uso de rosiglitazona no está asociado con un aumento significativo del riesgo de infarto de miocardio o de muerte cardiovascular¹³⁰. El tratamiento con rosiglitazona tiene un efecto antiesteatogénico sustancial en el primer año de tratamiento, pero sin beneficio adicional con un tratamiento más prolongado a pesar de su efecto mantenido sobre la sensibilidad a la insulina y las transaminasas. Esto sugiere que la mejora de la sensibilidad a la insulina puede no ser suficiente para el tratamiento de NASH¹³¹. También se ha observado que la terapia TZD en ausencia de modificaciones del estilo de vida no es efectiva. Algunos estudios informan que la NASH a menudo se repite después de la interrupción de la terapia con TZD¹³¹. La necesidad de terapia a largo plazo es problemática debido a los efectos secundarios.

Un tratamiento potencial atractivo implica la combinación de TZD con otros fármacos que mejoran su eficacia o mejoran sus efectos secundarios de aumento de peso. En un estudio con 137 sujetos con NASH diagnosticados mediante biopsia, recibieron 4 mg de rosiglitazona dos veces al día; 4 mg de rosiglitazona + 500 mg de metformina dos veces al día o 4mg de rosiglitazona dos veces al día + 50 mg de losartán una vez al día durante 48 semanas. El resultado primario reveló que los grupos de tratamiento no difirieron

significativamente en los parámetros histológicos investigados, indicando que no hubo mayor beneficio de las combinaciones con fármacos en comparación con la rosiglitazona sola¹³². Un artículo de revisión de práctica clínica basado en la evidencia recientemente publicada sugiere que la combinación de pioglitazona con vitamina E es una buena elección farmacológica para los pacientes con NASH probada por biopsia, aunque la evidencia sobre la seguridad y eficacia a largo plazo de este tratamiento es insuficiente¹³³.

Las guías americanas para el tratamiento de NAFLD recomiendan el uso de la pioglitazona para el tratamiento de la esteatohepatitis en pacientes con biopsia positiva para NASH³⁸. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los pacientes que han participado en los ensayos de investigación para pioglitazona fueron no diabéticos, y que la seguridad y la eficacia de pioglitazona a largo plazo en pacientes con NAFLD todavía no está definida³⁸.

Hipolipemiantes

La esteatosis hepática está fuertemente asociada con obesidad, dislipemia y riesgo de ECV. Se han evaluado dos tipos de fármacos hipolipemiantes para el tratamiento de la NASH¹¹²:

- Inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas) que inhiben la síntesis de colesterol hepático.
- Antagonistas de la proteína Niemann-Pick C1-like (ezetimiba), que limita la absorción de colesterol desde el intestino delgado.

Dado que estos medicamentos también tienen efectos antiinflamatorios posibles, se ha investigado su posible acción antioxidante y antiinflamatoria a nivel hepático en los pacientes con NAFLD/NASH.

Nelson et al.¹¹² evaluaron la utilidad de la terapia con simvastatina en pacientes con NASH diagnosticada mediante biopsia e hiperlipidemia. En comparación con placebo, el grupo de simvastatina mostró una reducción del 26% en la lipoproteína de baja densidad, pero no hubo mejoras estadísticamente significativas en los niveles séricos de

aminotransferasa, esteatosis hepática, actividad necroinflamatoria o estadio de la fibrosis.

Un estudio reciente llevado a cabo por Takeshita et al.¹³⁴ concluyó que la administración de ezetimiba a una dosis de 10 mg/día durante 6 meses se asoció con una mejoría de la fibrosis hepática. Sin embargo, el tratamiento con ezetimiba también condujo a un aumento de los ácidos grasos hepáticos de cadena larga en los pacientes con NAFLD. Otro estudio reciente sobre el uso de ezetimiba en NASH informó que el uso de ezetimiba en NASH no redujo la grasa hepática¹³⁵.

En conclusión, las estatinas pueden mejorar los resultados adversos de las afecciones comúnmente asociadas con NASH (hiperlipidemia, DM), justificando potencialmente su uso en pacientes con NASH. Mientras que la administración de estatinas puede ayudar a mejorar la situación metabólica y reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular en NAFLD/NASH, su uso en el tratamiento de NASH no ha sido aprobado debido a la falta de ensayos controlados aleatorios, incluyendo evidencia histológica.

Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina

Los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina y los bloqueadores de los receptores de la angiotensina son fármacos efectivos para el tratamiento de la hipertensión. Existen datos que muestran que estos fármacos son útiles para retardar la progresión de la fibrosis en la nefropatía diabética y la insuficiencia cardíaca. La función del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) en NAFLD ha sido objeto de interés considerable en los últimos años debido a que este sistema puede regular la fibrosis y la reparación tisular, y por tanto es un objetivo para el tratamiento con bloqueadores RAAS¹¹².

El RAAS es una cascada hormonal responsable de controlar las funciones cardiovasculares, renales y suprarrenales, regulando el equilibrio hidroelectrolítico y la presión arterial. Sin embargo, datos recientes muestran que la interacción contra RAAS reduce la presión arterial y mejora la sensibilidad a la insulina. La supresión de RAAS

mejora la señalización de insulina intracelular mediante la activación de PPAR- γ , lo que conduce a un mejor control de la proliferación de tejido adiposo y la producción de adipocinas. Además, la supresión de RAAS está asociada con la prevención de la activación hepática de células estrelladas y, en consencuencia, la prevención de la inflamación hepática y la fibrogénesis. Además, la supresión local de RAAS en el hígado disminuye el ciclo vicioso que une la esteatosis con la necroinflamación y previene la fibrosis. Por otro lado, la modulación de los efectos pancreáticos de Angiotensina II hace posible alcanzar una secreción adecuada de insulina y un mejor equilibrio metabólico.

Varios estudios^{136,137} han investigado la eficacia de los bloqueadores RAAS, mostrando su efecto beneficioso en los pacientes con NAFLD. Considerando el uso estandarizado de los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina para el tratamiento de la HTA, uno de los componentes del síndrome metabólico, sería interesante el desarrollo de ensayos clínicos controlados y aleatorizados para estudiar el efecto de estos fármacos en NAFLD.

Antioxidantes. Vitamina E

Se ha demostrado que muchos antioxidantes muestran potenciales efectos beneficiosos a nivel hepático¹¹². El estrés oxidativo y el agotamiento de los antioxidantes endógenos son los principales mecanismos responsables del daño hepático y la progresión de la enfermedad en los pacientes con NAFLD/NASH.

Un antioxidante que ha sido bien estudiado para el tratamiento de la NASH es la vitamina E (α -tocoferol), que es un eliminador de radicales libres soluble en grasa, así como un antioxidante de cadena en las reacciones de radicales libres, como la peroxidación de lípidos. Se propone que la vitamina E actúa sobre los PPAR, los genes reguladores de la apoptosis y el factor de crecimiento transformante beta 1, que se cree que promueve la fibrosis. Los datos sugieren que la vitamina E está asociada con la disminución de los niveles de aminotransferasa y con la mejoría de la histología hepática en los pacientes con NAFLD. Un gran ensayo controlado aleatorizado de pacientes adultos con y sin DM halló que, comparada con placebo, la vitamina E

durante 96 semanas mejoró significativamente los niveles de aminotransferasa sérica, la esteatosis hepática y la inflamación lobular en comparación, pero no la extensión de la fibrosis hepática¹³⁸. Más recientemente, el estudio TONIC¹³⁹ mostró mejoras histológicas significativas en niños con NASH diagnosticada por biopsia que tomaron vitamina E. Otro ensayo controlado aleatorizado¹⁴⁰ informó que 6 meses de administración de vitamina E (1000 UI/d) y vitamina C (1000 mg/día) dieron como resultado una mejoría significativa de la fibrosis hepática en pacientes con NAFLD. Así pues, basándonos en la literatura actual, el tratamiento con vitamina E parece ser una buena opción para mejorar la histología y la actividad aminotransferasa en los pacientes con NAFLD. Las guías estadounidenses para el tratamiento de NAFLD recomiendan el uso de la vitamina E como farmacoterapia de primera línea para pacientes no diabéticos con NASH diagnosticada por biopsia³⁸.

Sin embargo, hay que señalar que se han planteado serias cuestiones con respecto a la inocuidad del tratamiento a largo plazo con vitamina E. La vitamina E no se recomienda en los pacientes con NAFLD con diabetes y alto riesgo de enfermedad cardiovascular. El tratamiento con vitamina E tampoco se recomienda en los pacientes con NAFLD sin biopsia hepática o cirrosis. En realidad de acuerdo con las pautas americanas para el tratamiento de la NAFLD, la vitamina E no se recomienda para tratar la NASH en pacientes diabéticos, NAFLD sin biopsia hepática o cirrosis¹¹².

Sigue existiendo la necesidad de nuevas investigaciones con periodos de seguimiento más largos para examinar la seguridad y la eficacia de la vitamina E, particularmente con respecto a los puntos finales importantes, como la prevención de la cirrosis y la supervivencia a largo plazo en pacientes con NAFLD¹¹². Los estudios futuros también deben determinar cuánto tiempo los pacientes con NASH deben continuar con la terapia con vitamina E.

Acido ursodesoxicólico

El ácido ursodesoxicólico (UDCA) es un ácido biliar hidrofílico con propiedades antiinflamatorias, antiapoptóticas e inmunomoduladoras que pueden hacer que sea útil para el tratamiento de la NASH.

Los estudios clínicos no controlados muestran que UDCA tiene efectos beneficiosos sobre NASH. Laurin et al.¹⁴¹ estudiaron que el tratamiento de NASH con UDCA durante 12 meses mejoró significativamente la fosfatasa alcalina, la ALT y la esteatosis hepática. Un ensayo clínico controlado, aleatorizado, multicéntrico, doble ciego¹⁴², que comparó placebo con dosis altas de UDCA (28-35 mg/kg por día) en 126 pacientes con NASH diagnosticada por biopsia y niveles elevados de ALT. En este análisis, la dosis alta de UDCA mejoró significativamente los niveles de aminotransferasa, marcadores séricos de fibrosis y parámetros metabólicos seleccionados. Por otra parte, un estudio aleatorizado, controlado con placebo¹⁴³ que realizó una prueba a dosis altas de UDCA (23-28 mg/kg/día) no mostró efectos beneficiosos de la UDCA en el tratamiento de la NASH.

En conclusión, los datos actuales no muestran ningún beneficio sustancial de la UDCA en el tratamiento de la NASH, y las pautas americanas no recomiendan UDCA para el tratamiento de NAFLD/NASH³⁸.

Ácido obeticoólico

El ácido obeticoólico es un ácido biliar sintético que actúa como un potente activador del receptor nuclear X farnesoide, y que reduce la grasa hepática y la fibrosis en modelos animales de enfermedad hepática grasa.

Un ensayo multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo, paralelo y aleatorizado en centros médicos estadounidenses¹⁴⁴ recientemente evaluó la eficacia del ácido obeticoólico en pacientes con NASH. Los pacientes fueron asignados al azar 1:1 para recibir tratamiento por vía oral con ácido obeticoólico (25 mg al día) o placebo durante 72 semanas. Después de un período de seguimiento, el ácido obeticoólico se asoció con mejoría en la histología hepática, en comparación con placebo. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre los efectos beneficiosos y la seguridad de este fármaco.

Biciclol

El biciclol es un compuesto sintético que protege al hígado contra la oxidación y es ampliamente utilizado para tratar las infecciones víricas crónicas por virus hepatitis B y C en la República Popular China.

Han et al.¹⁴⁵ han investigado recientemente la eficacia del biciclol en 248 pacientes diagnosticados de NAFLD y resistencia insulínica. Los pacientes se sometieron a un cambio en el estilo de vida y a tratamiento con metformina (500 mg por vía oral tres veces al día). Posteriormente fueron asignados al azar a dos grupos de tratamiento de 24 semanas: biciclol 25 mg tres veces al día o vitamina E 100 mg tres veces al día. Los exámenes histológicos del hígado revelaron que ambos grupos mostraron disminución de la esteatosis, de la infiltración inflamatoria, de la balonización de los hepatocitos y de la puntuación de la actividad de NAFLD después del tratamiento. Sin embargo, las disminuciones en la infiltración inflamatoria hepática y las puntuaciones NAS fueron estadísticamente mayores en el grupo biciclol en comparación con el grupo de vitamina E. Los autores concluyeron que se necesitan más estudios controlados aleatorizados para evaluar la eficacia y la seguridad del biciclol como opción de tratamiento para los pacientes con NAFLD.

Vitamina D

Durante mucho tiempo se ha considerado que la vitamina D sólo tiene función en el metabolismo óseo. Sin embargo, esta vitamina ha sido recientemente reconocida como una hormona con propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antifibróticas. Muchos autores plantean la hipótesis de que los bajos niveles de vitamina D están fuertemente asociados con los componentes del síndrome metabólico y se ha informado que los niveles séricos de vitamina D están inversamente relacionados con el índice de masa corporal (IMC), el contenido de grasa corporal, la HTA, la resistencia insulínica y la DM¹⁴⁶.

El hígado es un órgano central en la síntesis de vitamina D. La deficiencia de vitamina D está frecuentemente presente en la enfermedad hepática crónica, y se ha observado una asociación entre los niveles de vitamina D y NAFLD tanto en adultos como en niños. Targher et al.¹⁴⁷ informaron que los niveles de vitamina D estaban inversamente relacionados con los rasgos histológicos de NAFLD/NASH probados con biopsia. Estos hallazgos han sido confirmados por otros autores. Además, la vitamina D ejerce efectos antiproliferativos y antifibróticos sobre la progresión de la fibrosis en la NAFLD.

Las observaciones anteriores sobre el vínculo entre los niveles séricos de vitamina D, los factores de riesgo NAFLD y la severidad de NAFLD sugieren que la suplementación con vitamina D podría representar una nueva opción terapéutica en el manejo de la NASH. Se necesitan otros estudios bien diseñados para investigar esta posibilidad.

Ácidos grasos omega-3

Actualmente aprobado en los Estados Unidos para tratar la hipertrigliceridemia. Han sido investigados para tratar NAFLD tanto en animales como en seres humanos. Una revisión reciente de Masterton et al.¹⁴⁸ de la literatura publicada relacionada con los ácidos grasos omega-3 encontraron una evidencia a nivel experimental para apoyar el uso de ácidos grasos omega-3 en NAFLD, pero la interpretación de los estudios en humanos fue limitada por la pequeña muestra.

3.1.6.3. Cirugía bariátrica

La obesidad y la resistencia insulínica representan el principal camino patológico hacia NAFLD y NASH. La pérdida de peso es una recomendación de primera línea para las personas con NAFLD. La cirugía bariátrica conduce a la pérdida de peso a largo plazo y mejora los trastornos relacionados con la obesidad¹¹². La mayoría de los pacientes sometidos a cirugía bariátrica presentan esteatosis hepática asociada, por lo que ha habido un interés en promover la cirugía bariátrica como una opción de tratamiento potencial para NAFLD/NASH.

No hay ensayos clínicos controlados que evalúen ningún tipo de cirugía bariátrica para el tratamiento de NAFLD o NASH. Sin embargo, son varios los estudios de cohortes retrospectivos y prospectivos que compararon la histología del hígado en los individuos severamente obesos después de la cirugía bariátrica. Una limitación importante en la mayoría de estos estudios, es que se realizaron biopsias hepáticas después del bypass a intervalos variables y sólo en pacientes seleccionados³⁸. Una excepción es el estudio de Mathurin et al.¹⁴⁹, que correlacionaron prospectivamente datos metabólicos con histología hepática antes, 1 y 5 años después de la cirugía bariátrica en 381 pacientes adultos con obesidad severa. La técnica quirúrgica fueron las siguientes: banda gástrica (56%), bypass bilio-intestinal (23%) y bypass gástrico (21%). Comparado con la biopsia basal, hubo una mejoría significativa en la prevalencia y gravedad de la esteatosis al año y a los 5 años tras la cirugía bariátrica. La mayoría de los beneficios histológicos fueron evidentes al año, sin apreciarse diferencias en la histología hepática a los 5 años.

Caiazzo et al.¹¹² realizaron un estudio longitudinal prospectivo que siguió a 1236 pacientes obesos hasta 5 años después de la derivación gástrica en Y de Roux o banda gástrica ajustable. El objetivo fue investigar la eficacia de estos métodos quirúrgicos para el tratamiento de la NAFLD relacionada con la obesidad. Las muestras de biopsia hepática se realizaron a 1201 pacientes al inicio, 578 pacientes al año y 413 pacientes a los 5 años. Su análisis reveló que todos los parámetros de NAFLD mejoraron después de la cirugía, con mejoría significativamente mayor después de la derivación gástrica en Y de Roux que después de la banda gástrica ajustable.

Dos metaanálisis^{150,151} con 144145 pacientes, evaluaron el efecto de la cirugía bariátrica en la histología hepática en pacientes con NAFLD. El metaanálisis de Mummadi et al.¹⁵¹ mostró que la esteatosis, esteatohepatitis y la fibrosis parecen mejorar o resolverse tras la cirugía bariátrica. Sin embargo, una revisión Cochrane¹⁵⁰ concluyó que la falta de ensayos clínicos o estudios clínicos cuasialeatorios impide la evaluación de los beneficios y los daños de la cirugía bariátrica para los pacientes con EHNA.

En conclusión, la evidencia actual sugiere que la cirugía bariátrica en los pacientes con NAFLD/NASH disminuirá el grado de fibrosis, de inflamación hepática y de fibrosis. Sin embargo, NAFLD por sí misma no es una indicación para la cirugía bariátrica. Se necesitan más investigaciones para determinar los efectos beneficiosos de la cirugía bariátrica en los pacientes que tienen un alto riesgo de desarrollar cirrosis hepática. También hay una necesidad de más datos sobre el papel de la cirugía en la modulación de las complicaciones relacionadas con la NAFLD, como el carcinoma hepatocelular o el trasplante hepático.

3.1.6.4. Otros tratamientos: flebotomías

Los pacientes con NAFLD y síndrome metabólico a menudo muestran un aumento del depósito de hierro hepático y unos niveles elevados de ferritina sérica. Los datos disponibles indican que entre el 20% y el 30% de los pacientes con NAFLD muestran hiperferritinemia con acumulación leve de hierro hepático, lo que comúnmente se denomina síndrome de sobrecarga de hierro dismetabólico. Además de la inducción directa del daño hepático, el exceso de hierro está implicado en la patogénesis del síndrome metabólico. La hiperferritinemia y el aumento de las reservas de hierro también se han asociado con carcinoma hepatocelular en pacientes con NAFLD.

Valenti et al.¹⁵² investigaron la eficacia de la flebotomía en 38 pacientes con NAFLD, que fueron aleatorizados a flebotomía (n=21) o cambios en el estilo de vida (n=17). La flebotomía se realizó mediante la eliminación de 350 ml de sangre cada 10-15 días. Este procedimiento no condujo a efectos adversos. El principal resultado del estudio fue la mejoría del daño hepático en dos años según la puntuación de la actividad de la NAFLD. El resultado secundario fue la mejora de las enzimas hepáticas, incluyendo ALT, AST y GGT. La flebotomía se asoció con la normalización de los parámetros del hierro y la mejora de las enzimas hepáticas. En comparación con los cambios en el estilo de vida, la flebotomía se asoció con una mayor tasa de mejora de daño histológico hepático en pacientes con NAFLD e hiperferritinemia.

Un ensayo prospectivo de 6 meses, controlado¹⁵³, examinó el impacto de la flebotomía en el contexto del asesoramiento sobre el estilo de vida en pacientes con NAFLD. En contraste con los hallazgos anteriores, los resultados de este estudio mostraron que la reducción de ferritina por flebotomía no mejoró las enzimas hepáticas, la infiltración grasa hepática o la resistencia insulínica entre los sujetos con NAFLD.

Para resolver esta controversia, se deben realizar ensayos más grandes para evaluar el tratamiento con flebotomía en pacientes con NAFLD/NASH grave e hiperferritinemia resistente a cambios en el estilo de vida.

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de la epidemiología, la historia natural y la patogénesis de la NAFLD, no queda terapia efectiva para los pacientes con NAFLD en la población general. Se han estudiado varios agentes farmacológicos en un esfuerzo por mejorar la resistencia insulínica y los mediadores proinflamatorios que pueden ser responsables de la progresión de la NASH. Se necesitan investigaciones adicionales para establecer la eficacia y seguridad de estos medicamentos.

También es importante tratar las anormalidades metabólicas que a menudo se asocian con el NAFLD / NASH, como la hipertensión, la diabetes, la dislipidemia y la obesidad. La terapia con estatinas debe ser considerada para pacientes con NAFLD/NASH e hipercolesterolemia, mientras que el tratamiento con TZDs puede ser iniciado para los pacientes con diabetes de NAFLD/NASH. Los bloqueadores RAAS podrían ser útiles para los pacientes con hipertensión arterial, especialmente si la diabetes también está presente^{38,112}.

En conclusión, no disponemos de una terapia farmacológica recomendada y efectiva para el tratamiento de la esteatosis hepática. Los cambios en el estilo de vida incluyendo cambios en la dieta, pérdida de peso y ejercicio físico siguen siendo los pilares fundamentales de tratamiento.

3.2. MELATONINA

En 1958, en la Escuela de Medicina de la Universidad de Yale, Lerner y cols. descubrieron la melatonina (Fig.26), una hormona natural secretada por la glándula pineal en el centro del cerebro (Wurtman 1989). Se biosintetiza a partir de triptófano por vía de la serotonina, y está presente en casi todas las especies animales, y posiblemente, incluso en todas las plantas. La melatonina participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos.

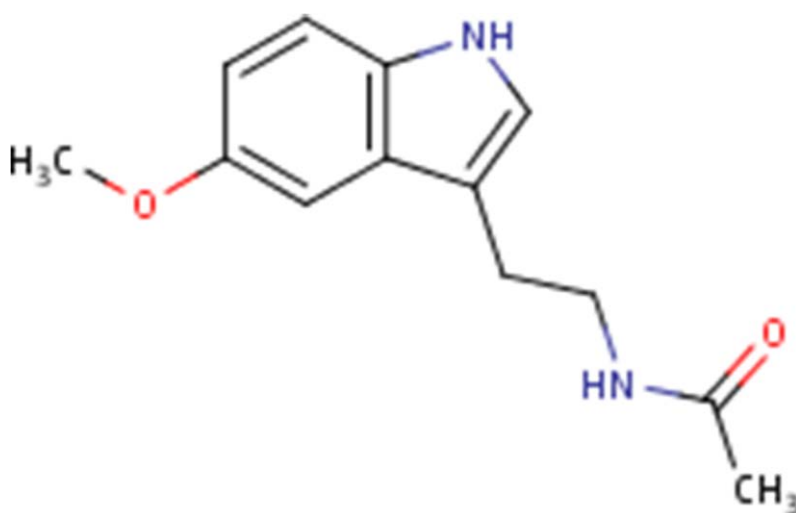


Fig.26. Molécula de melatonina

3.2.1. SÍNTESIS

La mayoría de los estudios relacionados con la síntesis de la melatonina se han realizado en vertebrados, en particular en mamíferos (hámster, rata, ratones). En los mamíferos, el precursor inicial de la melatonina, es un aminoácido esencial, el triptófano, que es convertido en 5-hidroxi-triptófano y luego en serotonina. La serotonina es acetilada por la enzima serotonina-N-acetiltransferasa (SNAT) dando lugar a la N-acetil-serotonina. Esta enzima ha sido la más estudiada en la síntesis de melatonina. Se ha aceptado durante mucho tiempo que la SNAT es la enzima limitante de la velocidad de síntesis de melatonina, controlando la cantidad de melatonina

producida. Esta idea se basa en que la actividad de la SNAT tiene un evidente ritmo circadiano, que coincide con las alteraciones de los niveles de melatonina, a nivel pineal y en sangre. La N-acetilserotonina posteriormente es transformada a melatonina mediante la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (ASMT), que es considerada hoy en día por muchos investigadores como la enzima limitante de la velocidad de síntesis de melatonina¹⁵⁴.

La síntesis de melatonina no se encuentra exclusivamente en la glándula pineal, se ha descrito su secreción en numerosos órganos periféricos, tales como la retina, la médula ósea, la piel¹⁵⁵, el tracto gastrointestinal y en algunas células como los linfocitos y plaquetas, prácticamente cualquier célula del organismo es capaz de sintetizar melatonina. Las mayores cantidades de melatonina no parecen estar producidas en la glándula pineal, sino más bien en el intestino y en la piel¹⁵⁵. Parece que la regulación de la producción de melatonina extrapineal (a excepción de la retina) utiliza diferentes mecanismos de los de la glándula pineal. En estos órganos, la producción de melatonina no es sensible al ciclo luz/oscuridad, sino que está regulada por las demandas de los tejidos locales. Se ha planteado la hipótesis de que las mitocondrias son el sitio primario de la producción de melatonina¹⁵⁶, y estos orgánulos sí contienen niveles de melatonina mayores que en la sangre. Esta producción mitocondrial explica la teoría de por qué todas las células del organismo tienen la capacidad de producir melatonina. Los niveles de melatonina mitocondriales en otros tejidos son independientes de la glándula pineal, ya que la pinealectomía no logró reducir las concentraciones de melatonina.

El estudio de la melatonina en las plantas tiene una historia mucho más corta que en los animales. La melatonina no se identificó en plantas hasta 1995, y su ruta sintética ha sido descubierta recientemente. Hay varias diferencias en cuanto a la síntesis de melatonina en plantas y en animales¹⁵⁷. La producción de melatonina en las plantas es significativamente mayor que en los animales. En los animales, el precursor inicial de la síntesis de melatonina es el triptófano, que sólo está disponible a través de la dieta. Las plantas pueden sintetizar triptófano, así que en la producción de melatonina no está limitada a la disponibilidad del triptófano. En las plantas el triptófano primero se descarboxila y luego se hidroxila, mientras que en los animales se encuentra invertido este orden¹⁵⁸(Fig.27).

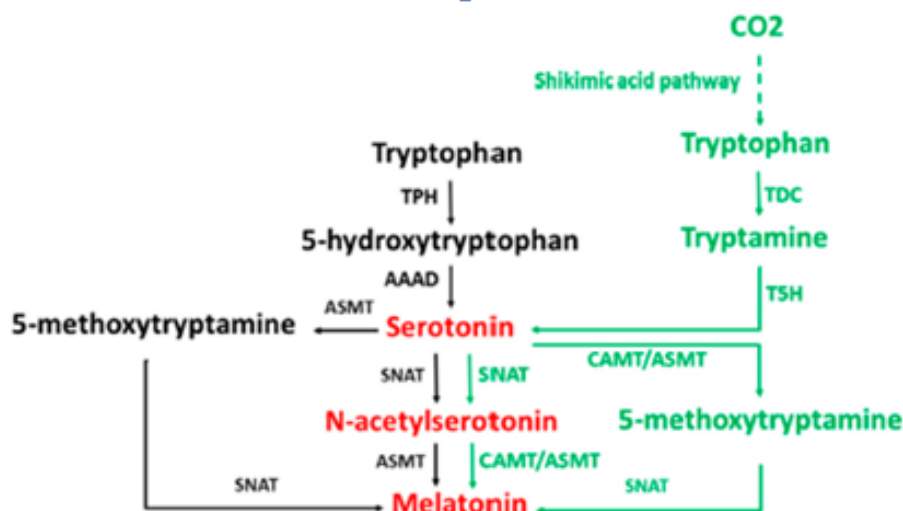


Fig.27. Esquema que muestra la síntesis de melatonina a través de su precursor el triptófano, en vertebrados (en negro) y en plantas (en verde). AAAD: aromatas-a-amino-ácido-decarboxilasa. SNAT: serotonin-N-acetil-transferasa. ASMT: N-acetil-serotonin-O-metil-transferasa. TDC: triptófano-decarboxilasa. T5H: triptamin-5-hidroxilasa. CAMT: caffeic-ácido-O-metil-transferasa.

Mientras que los patrones de secreción intra-individuales son bastante predecibles, las comparaciones de patrones de secreción entre diferentes individuos muestran una considerable variación. Según Wetterber¹⁵⁹, el ritmo de melatonina (síntesis/secreción) está determinado genéticamente, una opinión que ha recibido el apoyo de numerosos estudios.

3.2.2. SECRECIÓN

Una vez formada, la melatonina se libera hacia el torrente sanguíneo y el líquido cefalorraquídeo. Su vida media es de unos 30 minutos. Los niveles de melatonina no son constantes a lo largo del día. De hecho una de las características más destacadas con respecto a la biosíntesis en la glándula pineal es su variabilidad a lo largo del ciclo de 24 horas. El estímulo más importante para su producción son los cambios en la iluminación ambiental¹⁶⁰. En los vertebrados, la melatonina se sintetiza en la glándula pineal y se secreta en la oscuridad como un mensaje hormonal del fotoperiodo. Las concentraciones de melatonina nocturna en plasma, son hasta diez veces mayores que las

concentraciones durante el día. Las concentraciones plasmáticas de melatonina durante el día son bajas, ascendiendo después de la aparición de la oscuridad, con un pico en la mitad de la noche, a continuación existe una fuerte caída antes del inicio de la luz solar¹⁵⁷.

El ritmo de la síntesis se debe principalmente a un oscilador que se encuentra en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Este oscilador suele ser arrastrado a un ritmo de 24 horas por el medio ambiente y las condiciones de iluminación, que se perciben en los receptores de la retina. Tras la información transducida a través de la retina, la melatonina se secreta durante la noche, y la señal de melatonina es proporcional durante todo el período nocturno. Gran parte de la investigación referente a glándula pineal se ha centrado en averiguar las respuestas del cerebro humano a los ritmos de esta hormona. Los estudios más convincentes hablan de dos funciones de la melatonina a nivel central el ser humano: la participación de la secreción nocturna para iniciar y mantener el sueño y el control del ritmo de melatonina día/noche de otros ritmos de 24 horas (ritmo circadiano)¹⁵⁷.

La producción de melatonina disminuye gradualmente a medida que se avanza en edad, habiéndose demostrado que los niveles de melatonina son menores en ancianos¹⁶¹. La secreción comienza durante los primeros meses de vida, a continuación, se incrementa rápidamente, llegando a un pico sobre la edad de 1 a 3 años. Luego descienden ligeramente a una meseta que persiste a lo largo de la edad adulta. A partir de los 70 años inicia un marcado descenso. Esta disminución puede reflejar la progresiva calcificación de la glándula pineal y la pérdida del tejido secretor en las personas mayores.

Los alimentos ricos en serotonina, como los cereales (avena, arroz y maíz) las frutas (cerezas, patatas y tomates), frutos secos y el vino tinto son considerados precursores de la melatonina.

3.2.3. TOXICIDAD

Los niveles plasmáticos de melatonina durante la vigilia en humanos se encuentran en el rango de 5 a 20 pg mL⁻¹ entre las 12:00 h, a.m. y las 20:00 h. Durante el sueño los niveles plasmáticos pueden exceder los 55 a 90 pg mL⁻¹, sin embargo existe una marcada variación interindividual, siendo su concentración dependiente de la edad¹⁶².

La toxicidad aguda de la melatonina como se ha visto en estudios en animales y humanos es extremadamente baja.

La melatonina puede causar efectos adversos menores, como dolor de cabeza, insomnio, erupción cutánea, dolor de estómago y pesadillas.

Los estudios de los sujetos humanos que recibieron dosis variables (1-6 g/día) durante 30-45 días, a los que después se les ha realizado una batería de pruebas bioquímicas elaboradas a detectar la posible toxicidad, han concluido que, además de somnolencia, todos los resultados fueron normales al final de la prueba.

3.2.4. EFECTOS

- Efecto sobre el ritmo circadiano, insomnio.
- Regulación del sistema inmunológico (3).
- Modificaciones del centro vasomotor, termorregulación.
- Propiedades antioxidantes. Las propiedades antioxidantes de la melatonina han demostrado experimentalmente proteger contra el envejecimiento, el cáncer, la arteriosclerosis y el daño hepático. Sin embargo no hay pruebas suficientes que apoyen la efectividad de la melatonina para el tratamiento de las secuelas cognitivas de la demencia.

3.2.4.1. Ritmo circadiano o ritmo sueño-vigilia

La exposición a la luz del día interrumpe la liberación de melatonina, mientras que el comienzo del crepúsculo estimula el reinicio de la liberación. La melatonina parece jugar un papel clave en la regulación de los ritmos circadianos corporales, y se ha utilizado desde el punto de vista terapéutico para el reentrenamiento de los ritmos circadianos alterados y para el tratamiento del insomnio.

La melatonina exógena tiende a producir un avance de fase cuando se administra en las últimas horas de la tarde¹⁶³, ya que su efecto es aditivo al de la melatonina endógena. Sin embargo, tomada temprano por la mañana, la melatonina exógena provoca una demora de fase al efecto de la luz del día.

El Jet lag o también conocido como descompensación horaria, disritmia circadiana o síndrome de los husos horarios, es un desequilibrio producido entre el reloj interno de una persona (que marca los periodos de sueño y vigilia) y el nuevo horario que se establece al viajar largas distancias, a través de varias regiones horarias.

Ensayos clínicos controlados y aleatorizados han demostrado que la melatonina es muy efectiva para prevenir o reducir la desadaptación horaria (jet lag) y el uso a corto plazo parece ser seguro. Existe un metanálisis publicado en la Cochrane¹⁶⁴ donde se analizan diez ensayos clínicos controlados y aleatorizados. Ocho de los diez ensayos concluyeron que la melatonina tomada antes de acostarse, una vez que el individuo ha llegado a su destino, disminuye la desadaptación horaria en los desplazamientos de cinco o más zonas horarias. No se detectaron diferencias entre las dosis diarias de 0,5mg y 5mg de melatonina, con la excepción de que los pacientes que tomaron 5mg se quedaron dormidos durante más tiempo y más rápido que los pacientes que tomaron 0,5mg. Una dosis más alta de 8 mg, no es más eficaz que la de 5mg.

El término insomnio se refiere a múltiples trastornos del sueño experimentados de una u otra forma en un alto porcentaje de la población. Alrededor del 10% de la población sufre insomnio de manera crónica. El tratamiento del insomnio hoy en día se considera un desafío. El insomnio se caracteriza por uno o más de los siguientes síntomas:

dificultad para quedarse dormido, despertar nocturno, despertar temprano por la mañana, disminuir la cantidad total de sueño o sueño reparador con somnolencia diurna, fatiga, irritabilidad y dificultad para concentrarse y realizar las tareas diarias. El insomnio se asocia como síntoma a otros trastornos psíquicos como la depresión o la ansiedad, pero también se relaciona con enfermedades cardiovasculares y enfermedades neoplásicas.

Con respecto al insomnio, la melatonina exógena se considera terapéutica, ya que puede afectar directamente a los parámetros del sueño en sí o afectar de manera indirecta. De manera directa, la melatonina disminuye la latencia del sueño, aumenta la eficiencia del sueño y aumenta el tiempo total de sueño. La hormona también puede afectar al sueño de forma indirecta, actuando a través de los mecanismos que controlan los ritmos circadianos de cambiar la eliminación gradual del ritmo del sueño.

Una revisión sistemática reciente¹⁶⁵ reúne cuatro estudios de calidad alta con 845 participantes en total que evalúan la eficacia de la melatonina en la consecución de un sueño de mejor calidad en personas con insomnio. Dos de ellos no consiguieron demostrar la hipótesis. Los otros dos restantes demostraron que la melatonina favorecía un sueño de mejor calidad, incluyendo un estudio grande con 791 sujetos. En dicho estudio se administró melatonina de liberación prolongada de 2mg a 791 pacientes entre 18 y 80 años antes de acostarse durante 3 semanas. 555 pacientes completaron un período de 6 meses. A las 3 semanas se hallaron diferencias significativas entre el grupo de melatonina y el grupo placebo, en cuanto al tiempo de latencia del sueño (variable principal) para el grupo de 55-80 años. La melatonina fue bien tolerada durante todo el período de 6 meses sin síntomas de abstinencia o de rebote tras la interrupción.

3.2.4.2. Función endocrina e inmunidad

Existe una relación estrecha y recíproca entre la glándula pineal y el eje hipófisis/suprarrenal. La melatonina modula la actividad de este eje y las acciones periféricas de los corticoides. La relación entre la melatonina y los corticoides es importante porque la hipercortisolemia crónica ha sido relacionada con varios aspectos del envejecimiento y la edad, asociada a los fenómenos de hiperglicemia, aterogénesis, alteración de la función inmune y cáncer.

3.2.4.3. Modificaciones del centro vasomotor

Al dormir por la noche, la PA normalmente cae en aproximadamente un 15% de los valores durante el día. Los pacientes en los que no se produce esta reducción, se considera HTA nocturna, que se ha asociado con mayor riesgo de enfermedad CV. Hay observaciones que sugieren que la melatonina juega un papel en la regulación de la PA nocturna: el aumento normal durante la noche de la concentración de melatonina en suero puede ser mitigado en los pacientes con HTA nocturna y que la administración de melatonina parece disminuir la PA, especialmente durante la noche.

3.2.4.4. Efectos antioxidantes de la melatonina

La hormona “antiaging”

Hay estudios que relacionan la pérdida de la melatonina y los fenómenos del envejecimiento. Algunos creen que los datos hasta la fecha apoyan la posibilidad de que el aporte exógeno puede ser beneficioso para retrasar el envejecimiento. Los niveles de melatonina disminuyen con la edad y el pico de melatonina nocturna es abolido prácticamente. Debido a la estrecha relación recíproca con los corticoides, la pérdida de la ritmicidad de la melatonina puede ser responsable de la desinhibición del eje hipófisis/suprarrenal que ha sido descrito como una característica del envejecimiento. Sin embargo, no hay ningún ensayo clínico en humanos que demuestre el efecto “antiaging” de la melatonina.

Cáncer

Se ha sugerido que el aumento constante de la incidencia de cáncer en los países desarrollados durante los últimos 100 años es causado por la rutina, la extensión artificial del fotoperíodo y a la contaminación lumínica.

Cáncer de mama: la evidencia clínica sugiere un papel de la melatonina en la prevención e incluso en el tratamiento del cáncer de mama. Por ejemplo, la amplitud circadiana de la hormona se redujo en más del 50% en pacientes con cáncer de mama vs pacientes con patología mamaria maligna y los niveles de melatonina alta se han encontrado en las muestras de orina de la mañana de las pacientes con cáncer de mama.

Cáncer de próstata y colorrectal: la amplitud circadiana de la melatonina se reduce en dos terceras partes de los pacientes con cáncer de próstata en comparación con aquellos que tienen HBP y fenómenos similares se han observado en pacientes con cáncer colorrectal.

Convulsiones

La glándula pineal que actúa principalmente pero no exclusivamente a través de la melatonina, se postula que es un órgano que promueve el equilibrio homeostático. La melatonina estabiliza la actividad eléctrica del sistema nervioso central y produce la sincronización rápida del EEG. Por el contrario, los animales a los que se ha realizado pinealectomía predisponen a sufrir ataques epilépticos.

Depresión

Los niveles nocturnos de melatonina son bajos en pacientes con trastorno depresivo mayor y trastorno de pánico. Sin embargo, la melatonina debe utilizarse con precaución en pacientes depresión, siempre sincronizada con el conjunto de la terapia de luz y el cambio de fase del sueño, ya que la alteración del ritmo circadiano normal que se provoca con el aporte exógeno, puede provocar una alteración del ritmo circadiano normal y empeorar la depresión.

Sistema nervioso central

La melatonina ha demostrado evitar la muerte celular y los daños inducidos en la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson. También disminuye el tamaño del infarto cerebral y edema después de la oclusión de la arteria cerebral media y por

isquemia-reperfusión en ratas. Además ha sido sugerida como un compuesto candidato a neuroprotector a los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica. En un estudio con 14 pacientes en diferentes etapas de enfermedad de Alzheimer, los suplementos de melatonina para 22-35 meses demostró una mejoría del sueño y no hubo deterioro cognitivo durante el tiempo de estudio. Los efectos neuroprotectores no están mediados por los receptores de melatonina, por lo tanto su efecto positivo se debe a su efecto antioxidante.

Actividad cardioprotectora

La actividad cardioprotectora, mediada por los efectos antioxidantes de la melatonina se ha observado en modelos experimentales de isquemia-reperfusión miocárdica y el infarto de miocardio. La melatonina reduce el tamaño del infarto, suprimió la frecuencia, así como la duración de la taquicardia ventricular y fibrilación, mejorando la supervivencia en estos modelos. Una revisión señaló que es capaz de reducir los niveles de colesterol en un 38% en sujetos humanos y ha reducido la presión arterial y los niveles de catecolaminas, quizás a través de la relajación de los músculos lisos en las paredes de la aorta.

Sistema gastrointestinal

Los efectos gástricos se han observado en varios modelos de las úlceras gástricas en varios laboratorios. Estos efectos también pueden estar relacionados con los efectos antioxidantes de la melatonina. En modelos experimentales de pancreatitis aguda, la melatonina ha demostrado efectos beneficiosos. Otras enfermedades en las que puede ser añadida a las terapias existentes incluyen el síndrome de intestino irritable, la colitis ulcerosa y la diarrea.

Enfermedades renales

La melatonina ha demostrado un efecto protector en insuficiencia renal por efecto antioxidante.

3.2.5. LA MELATONINA COMO POTENTE ANTIOXIDANTE

3.2.5.1. Estrés oxidativo

Los procesos de inflamación aguda, por ejemplo la sepsis o la hemorragia, dan lugar a un desequilibrio en la homeostasis de los procesos de oxidación, con el exceso de generación de especies reactivas de oxígeno (que incluyen oxidantes como el peroxinitrito y radicales libres como el hidroxilos y superóxido) y una deficiencia relativa de antioxidantes endógenos. Este estado se denomina estrés oxidativo¹⁶⁶.

Un radical libre es una molécula que contiene uno o más electrones desapareados. Por lo tanto, el estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de neutralizar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante.

Los radicales libres dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN, induciendo así la peroxidación lipídica y la degradación de proteínas, glúcidos y ADN.

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la mitocondria, produce la peroxidación lipídica. La peroxidación lipídica aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo cual conduce a una pérdida de la integridad de dicha membrana y al aumento del citocromo c en el citoplasma, que activa la actividad de las caspasas, las cuales inicial la muerte celular apoptótica (Fig.28).

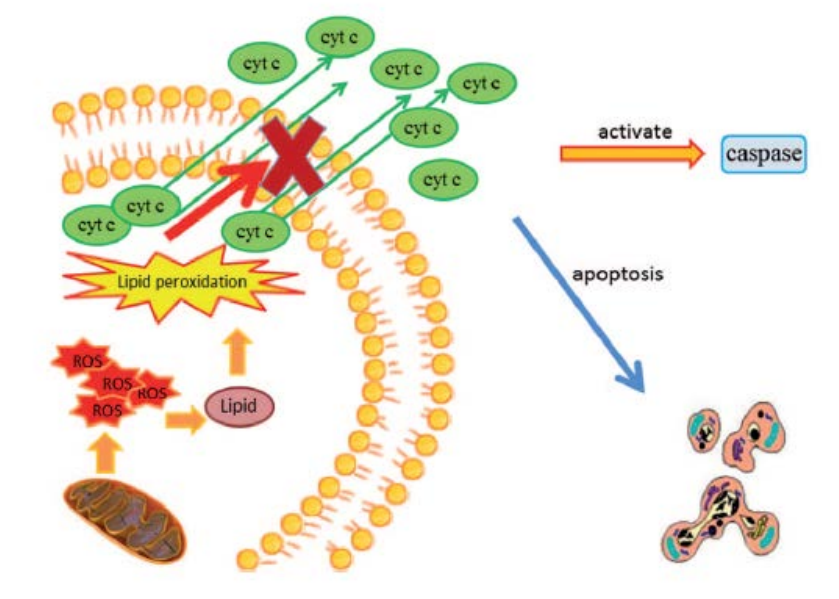


Fig.28. El papel de la mitocondria en la muerte celular apoptótica y en la necrosis tisular. La sobreproducción de ROS supone la peroxidación lipídica, la pérdida de la integridad de la membrana y el aumento del citocromo c en el citoplasma celular.

3.2.5.2. Melatonina y estrés oxidativo

La capacidad antioxidante de gran alcance de la melatonina suele atribuirse a su capacidad para eliminar radicales libres por la donación de electrones¹⁶⁷.

Por ejemplo la melatonina puede neutralizar los radicales hidroxilo (OH^\cdot), que resultan altamente tóxicos, mediante la formación de 3-hidroximelatonina y otros metabolitos que se excretan en la orina. Cuando la melatonina interactúa con el grupo OH, se inicia una cascada de reacciones en cadena (Fig.29) cuyo resultado es la formación de unos metabolitos, que a su vez actúan neutralizando otros radicales libres. Por lo tanto, una sola molécula de melatonina puede neutralizar hasta ocho o más radicales libres¹⁶⁸.

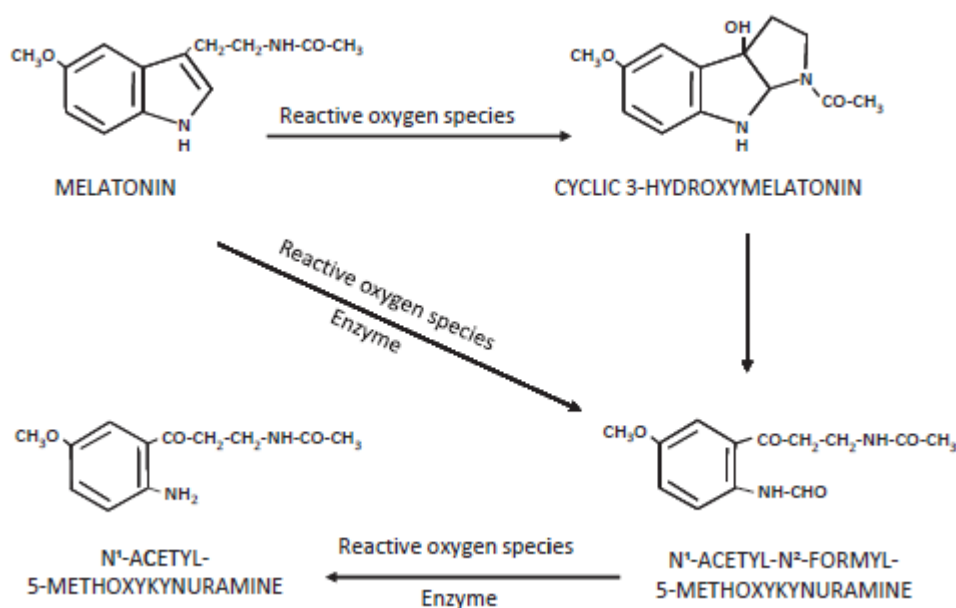


Fig.29. Cascada de reacciones que se producen cuando la melatonina interactúa con ROS.

La melatonina también detoxifica otros radicales libres tóxicos. Es capaz de neutralizar otras especies reactivas de oxígeno (ROS) además del radical hidroxilo (OH^\cdot) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$), etc. También es capaz de neutralizar especies reactivas de nitrógeno el óxido nítrico (NO^\cdot) o anión peroxinitrito (ONOO^-)¹⁶⁹.

Por otra parte, además de sus acciones de detoxificación directa, la melatonina también ejerce un efecto antioxidante indirecto debido a su capacidad para estimular la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatiónperoxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd). También es capaz de estimular la expresión y la síntesis de otras enzimas antioxidantes como la glutatión (GSH) y catalasas (CAT) que eliminan los radicales libres y sus precursores¹⁷⁰.

Otro efecto beneficioso de la melatonina descubierto en los últimos años, se produce a nivel de la mitocondria, durante el proceso de respiración celular. La respiración celular es el conjunto de reacciones bioquímicas por las cuales determinados compuestos orgánicos son degradados completamente, por oxidación (fosforilación oxidativa), hasta convertirse en sustancias inorgánicas, proceso que proporciona energía aprovechable

por la célula (en forma de ATP). Este proceso se realiza en la mitocondria. Así pues, las mitocondrias son los principales responsables de la generación de la energía celular a través de la fosforilación oxidativa, produciendo ATP, necesario para cualquier función celular. Durante el proceso de respiración mitocondrial se generan grandes cantidades de radicales libres dentro de las mitocondrias cuando los electrones se escapan a través de la cadena de respiración celular. Al estimular el complejo I y el complejo IV de la cadena de respiración mitocondrial, la melatonina reduce la fuga de electrones y así pues la generación de radicales libres. Además, la melatonina también contribuye al mantenimiento de la producción de ATP por las mitocondrias mediante el mantenimiento de altos niveles de glutatión mitocondrial^{171,172}.

Este poder de la melatonina como efecto antioxidante, depende de sus características químicas, ya que la melatonina es lipofílica e hidrófila, por lo tanto, atraviesa todas las membranas celulares con facilidad, y está a disposición de todas las células y de todos los tejidos.

La combinación de estas propiedades beneficiosas de la melatonina en la mitocondria, y su capacidad para eliminar directamente los radicales libres, así como de estimular las enzimas antioxidantes en todos los compartimentos celulares, hace que esta indolamina sea un potentísimo agente antioxidante y una sustancia protectora¹⁶⁸.

Se ha comprobado que la melatonina es un potente antioxidante y que los suplementos de melatonina podrían proteger contra algunas enfermedades tales como la aterosclerosis, el cáncer y la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo ninguno de estos usos propuestos se ha probado en un ensayo clínico controlado ni ha sido aprobado para su uso. La mayoría de los estudios no han proporcionado datos sobre niveles en plasma, y la mayoría no han comparado los efectos de la melatonina a las de los antioxidantes más conocidos¹⁶⁸.

3.2.5.3. Efecto de la melatonina sobre la peroxidación de ácidos grasos

Durante las últimas cuatro décadas, la peroxidación de ácidos grasos inducidos por los radicales libres ha sido estudiado con gran detalle como un proceso perjudicial que se produce en el plasma, así como en las membranas intracelulares.

La reacción de peroxidación lipídica se divide en tres fases sucesivas: la iniciación, la propagación y la terminación (Fig.30). Durante la iniciación, un radical libre desplaza al átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado, resultando una especie reactiva. Durante la fase de propagación, esta especie reactiva reacciona con una molécula de oxígeno, formando un lípido peroxilo (ROO•), que a su vez desplaza otro átomo de hidrógeno de otro ácido graso poliinsaturado, formando un lípido hidroperóxido (ROOH). Durante la fase de terminación se cree que tiene lugar por la interacción entre dos radicales libres, dando como resultado un producto no radical. Los hidroperóxidos de lípidos pueden sufrir degradación en hidrocarburos, alcoholes, éteres, epóxidos y aldehídos. Entre estos últimos, el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-alquenal (4-HDA) son de especial importancia, ya que pueden formar parte de fosfolípidos, proteínas y ADN.

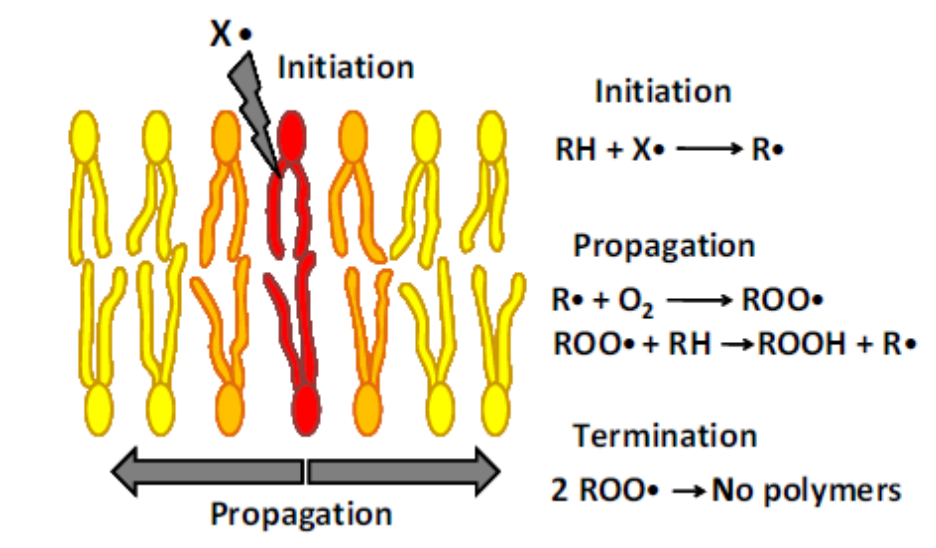


Fig.30. Fases de la peroxidación lipídica.

Debido a esto, muchos de los métodos de ensayo, han medido las concentraciones de MDA para conocer las lesiones inducidas por los radicales libres en las membranas celulares.

Estudios recientes han documentado la utilidad y la eficacia de la melatonina en la prevención de la elevación de las concentraciones de MDA y 4-HDA que ocurren en numerosas enfermedades y modelos toxicológicos experimentales realizados.

Como se ha visto en múltiples estudios, la acción protectora de la melatonina sobre la peroxidación lipídica se deriva de su capacidad para neutralizar los reactivos tóxicos que inician la cadena de acontecimientos que dan lugar a la peroxidación lipídica masiva.

Se ha visto que la melatonina detoxifica los dos mayores iniciadores de la peroxidación de ácidos grasos, el radical OH^\cdot y el ONOO^- . Sin embargo la melatonina no es particularmente eficaz en la neutralización del radical peroxilo (ROO^\cdot), es decir, la melatonina no tiene gran eficiencia como antioxidante. Se ha sugerido que los derivados de la melatonina tales como la 3-hidroxi-melatonina, son capaces de neutralizar ROO^\cdot con mayor eficiencia que la melatonina en sí. Esto quiere decir, que la melatonina, a través de sus metabolitos puede ser una indirecta antioxidante que rompe la cascada, no sólo en su inicio.

3.2.5.4. Efecto de la melatonina sobre la fluidez de membrana citoplasmática

Las membranas celulares están formadas por una bicapa de fosfolípidos, que forman una matriz donde se alojan proteínas que funcionan como transportadoras, canales iónicos o sistemas de receptores para hormonas y neurotransmisores. Singer y Nicolson¹⁷³ propusieron el modelo de mosaico fluido para definir las cualidades de la membrana citoplasmática celular, lo cual sugiere que las membranas celulares son estructuras fluidas. La fluidez (o viscosidad) de la membrana se refiere a su capacidad o facilidad de movimiento, representando. Varios agentes químicos y físicos modulan la

fluidez de los fosfolípidos de las membranas celulares, tales como: la longitud y el grado de saturación de las cadenas de ácidos grasos, la naturaleza de grupos de cabeza polares, que influye en la movilidad de las cadenas de hidrocarburos, la concentración de colesterol en la bicapa lipídica, la densidad de la proteína en la membrana, la temperatura de la membrana, la presencia de sustancias anfipáticas en la bicapa, por ejemplo esteroides, vitaminas, anestésicos y barbitúricos. Los cambios en la fluidez de la membrana son muy importantes para la homeostasis de diversas funciones celulares, incluyendo la supervivencia, la diferenciación y las vías de activación de la muerte celular¹⁶⁸.

La rigidez de la membrana citoplasmática que se produce en situaciones de estrés oxidativo, está ampliamente documentada. Se proponen dos razones como causa de esta pérdida de fluidez. En primer lugar, existe una alteración en la relación de ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados en la composición de la membrana, debido a que los radicales libres tienen una particular afinidad por los electron-rich unsaturated covalent bounds, que están presentes en los ácidos grasos poliinsaturados. Esto quiere decir, que el resultado final de la peroxidación lipídica es la alteración de los ácidos grasos poliinsaturados, lo cual produce una alteración en la integridad de las membranas celulares e intracelulares¹⁷⁴.

En segundo lugar, se ha propuesto que la formación de cross-linking entre los restos lipídicos de la membrana, puede limitar el movimiento dentro de la membrana citoplasmática, lo cual contribuye a su rigidez¹⁷⁵.

Dado que la melatonina reduce la peroxidación lipídica en las células, es lógico pensar que también mantendría las membranas celulares en estado óptimo de fluidez¹⁶⁸. El estudio inicial en el que se observó que la melatonina contribuía a la disminución de la rigidez de la membrana debido a la reducción de la peroxidación lipídica fue publicado en 1998 por García et al.¹⁷⁶ Este estudio empleó un modelo in vitro de peroxidación lipídica en microsomas hepáticos. Se observó un aumento de MDA y una pérdida de la fluidez de la membrana. Se observó que la melatonina impide el aumento de MDA y de la rigidez de la membrana. Dichas acciones fueron concentración-dependiente. En este estudio, la fluidez de la membrana microsomal se evaluó por espectroscopia de

fluorescencia. Este método está basado en la intercalación en la membrana, de una molécula fluorescente que cuando es iluminada por luz polarizada, emite una señal fluorescente. El grado de polarización de esta señal depende del estado de la movilidad de la sonda, que refleja el movimiento de los lípidos de la membrana citoplasmática.

Otra hipótesis sobre el efecto protector de la melatonina en la pérdida de fluidez de la membrana citoplasmática en situaciones de estrés oxidativo tiene que ver con la posición que esta indolamina ocupa en la bicapa lipídica. La melatonina se ubica preferentemente en la zona superficial de la bicapa lipídica, es decir, cerca del grupo de cabeza polar de los fosfolípidos. Se ha propuesto que este posicionamiento de la melatonina en las bicapas podría ser responsable del desorden observado en las colas de los fosfolípidos. Este desorden puede ser beneficioso en algunos procesos fisiopatológicos, ya que es generalmente aceptado que un trastorno mayor en los fosfolípidos de la membrana hace que las interacciones de los antioxidantes con los radicales lipídicos sean más eficientes, reduciéndose así los nocivos efectos de la peroxidación lipídica¹⁷⁷.

3.2.6. EFECTO HEPATOPROTECTOR DE LA MELATONINA

Con respecto a los efectos hepatoprotectores de la melatonina, un sin número de publicaciones han demostrado que la melatonina exógena puede utilizarse con éxito para tratar una gran variedad de condiciones fisiopatológicas.

3.2.6.1. La melatonina como terapia sobre el daño hepático por tóxicos

Numerosos agentes tóxicos incluyendo aflatoxinas, metales pesados, nicotina, tetracloruro de carbono, tioacetamida y toxinas derivadas durante los procesos sépticos, generan especies reactivas de oxígeno que generan daño molecular a los lípidos, proteínas y ADN, lo cual conlleva a la lesión de las células hepáticas y a su muerte. Estudios recientes confirman los beneficios de la melatonina en la reducción del daño celular generado como resultado del metabolismo de los agentes tóxicos. Estos efectos protectores son evidentes cuando la melatonina se administra como terapia única o en combinación con otros agentes protectores¹⁷⁸.

Se han ensayado las acciones de la melatonina como terapia sobre un modelo de daño hepático en vivo, midiéndose los parámetros de integridad hepática como variables. La melatonina parece ser una estrategia hepatoprotectora versátil en modelos experimentales de lesión hepática, tal como se ha demostrado in vivo en ratas, ratones y pollos.

Tetracloruro de carbono (CCl₄)

El tetracloruro de carbono (CCl₄) se ha utilizado tradicionalmente como disolvente de aceites, grasas, lacas, barnices y resinas. Es una de las toxinas más potentes conocidas que causan daño hepático. Produce severas necrosis hepáticas con elevación de las enzimas hepáticas y otros indicadores bioquímicos como la urea, las proteínas totales y la albúmina. Además, se observa que las ratas intoxicadas con CCl₄, sufren perturbaciones importantes de las membranas plasmáticas.

Kus et al.¹⁷⁹ lograron demostrar en 2005 que el tratamiento con melatonina previene el daño hepático inducido por CCl₄ en ratas. 24 ratas Wistar fueron divididas en tres grupos. Grupo I fue el control, grupo II fueron sometidas a CCl₄ durante un mes y grupo III fueron sometidas a CCl₄ y melatonina durante un mes. Se determinaron los niveles de AST, ALT, ALP y B en plasma. Todos estos parámetros fueron mayores en el grupo II. Los cambios histopatológicos a la sección hepática (apoptosis, necrosis, hemorragia y degeneración grasa) fueron más graves en el grupo II que en el III. La melatonina reduce significativamente la elevación de enzimas hepáticas, B total y conjugada en sangre, que son indicativos de daño hepático celular inducido por CCl₄. La melatonina disminuye la generación de NO⁻ mediante su capacidad para inhibir la óxido-nitro-sintetasa

Aranda et al.¹⁸⁰ utilizaron un modelo de rata para comparar los efectos beneficiosos de la melatonina y la pinolina en el daño hepático por CCl₄. Los autores observaron una elevación de las concentraciones de productos de peroxidación lipídica (MDA+4-HDA) en tejido hepático homogeneizado expuesto a CCl₄. Melatonina (10mg/kg/día/i.p) ejerció un efecto protector. La pinolina (10 mg/kg/ip) fue efectiva también aunque en

menor grado. También se midió la oxidación proteica (mediante la determinación de carbonilos proteicos), observándose una reducción del daño de los hepatocitos cuando se añade melatonina o pinolina en el medio de incubación con CCl₄.

La pentoxifilina (PTX) es un derivado de la metilxantina con propiedades antioxidantes. Se han probado los efectos antioxidantes de la PTX en el tratamiento del daño hepático por CCl₄ comparándolos con los efectos de la melatonina, y también el efecto sinérgico de ambos antioxidantes. Se observó un aumento significativo de los productos de peroxidación lipídica en los animales tratados con PTX, mientras que la melatonina produjo una disminución no significativa de los productos de peroxidación lipídica. El tratamiento con PTX y melatonina dio lugar a una disminución marcada de los productos lipídicos de oxidación, si se compara con la utilización de cada uno de los antioxidantes de manera individual. Por otra parte, los autores observaron que PTX y melatonina administrados solos o en combinación, elevan la actividad de las enzimas antioxidantes (catalasas, glutatión peroxidasa), con similar eficacia¹⁸¹. También se ha comparado la melatonina (10 mg/kg/día/ip) con la Vitamina E (100 mg/kg/día/ip) y con la L-carnitina (300 mg/kg/día/ip) en la mejora del daño hepático inducido por CCl₄. La vitamina E no reaccionó con los radicales de carbono y no fue capaz de bloquear la unión covalente CCl₃. La melatonina y la L-carnitina mejoraron las pruebas de función hepática y el contenido de MDA hepático, pero la melatonina fue mejor que la L-carnitina. La melatonina mostró una mayor estimulación de enzimas antioxidantes (glutatión)¹⁸².

Aflatoxinas

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos tóxicos derivados de los hongos, que se encuentran en una gran variedad de productos de la agricultura. Poseen efectos teratogénicos, inmunotóxicos y cancerígenos.

La aflatoxina B₁, metabolito de *Aspergillus flavus*, es un potente agente hepatotóxico y hepatocarcinogénico tras su activación por el citocromo p450. Su metabolito final reacciona con el DNA generando OH⁻ y H₂O₂ y produce una reducción en la acción de las enzimas SOD y CAT. Awney et al.¹⁷⁸, estudiaron en un modelo de rata, la acción de

la melatonina en la producción de H_2O_2 generado durante el metabolismo de la Aflatoxina B1 en los microsomas del hígado de la rata. Los resultados de este trabajo revelaron una reducción de los niveles de H_2O_2 en los animales tratados con melatonina, sin una elevación en el citocromo P-450.

Ozen et al.¹⁸³, utilizaron un modelo aviar y observaron la inmunorreactividad en la administración de aflatoxina más melatonina (10 mg/kg/vía oral) y en la administración de sólo aflatoxina. En el grupo en que se había administrado melatonina, se observó una disminución de ROS y de especies reactivas de nitrógeno. También se observó una elevación del glutatión (agente antioxidante) y una disminución de los niveles de MDA en el grupo tratado con melatonina.

Nicotina

Existen pocas publicaciones acerca del daño hepático producido por la nicotina. La nicotina es un alcaloide natural que genera estrés oxidativo mediante la producción de especies reactivas de oxígeno y disminuyendo la actividad de las enzimas antioxidantes.

En un modelo de rata, Mercan et al.¹⁸⁴ estudiaron los efectos hepatoprotectores de la melatonina en el daño hepático por nicotina. Los autores observaron que la melatonina reduce la nicotina mediante degeneración hidrópica y restaura los niveles de ATP, que estaban deprimidos por la nicotina. También se observó un aumento de los niveles de enzimas antioxidantes como la enzima GSH.

Tioacetamida

La tioacetamida (TAA) es un compuesto orgánico de azufre, utilizado como fungicida. La exposición aguda a este compuesto a altas dosis produce fallo hepático agudo y encefalopatía.

Se han realizado varios estudios en ratas que pretenden mostrar los efectos beneficiosos de la melatonina en el daño hepático por TAA. En un estudio reciente, Czechowska et al.¹⁸⁵ demostraron que la administración de melatonina (10 mg/kg/día/ip) redujo los

niveles de FA, ALT, AST en plasma en las ratas tratadas. También observaron que la melatonina tenía un efecto protector contra la fibrosis generada tras la administración de TAA. La melatonina también aumentó la actividad de la enzima antioxidante paraoxonasa 1. Estos hallazgos moleculares se correlacionaron con los resultados histológicos, observándose una acción protectora de la melatonina en la morfología hepática.

Quimioterápicos

El potencial terapéutico de los tratamientos quimioterápicos a menudo está limitado por su ototoxicidad, neurotoxicidad, cardiotoxicidad, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad. Se han realizado estudios sobre la interacción de la melatonina con los quimioterápicos y los beneficios de la melatonina contra el estrés oxidativo generado por estas drogas. Se han realizado estudios que muestran los efectos beneficiosos de la melatonina en el tratamiento con: Amitriptilina, Antraciclinas, Adriamicina, Doxorubicina, Cisplatino, Ciclofosfamida, Ciclosporina, Diazepam, Griseofulvina, Letrozol^{186,187}.

Metales pesados

Los metales xenobióticos tales como el cadmio, el mercurio, el plomo y el arsénico, interactúan con la célula causando el daño oxidativo de las macromoléculas, generando especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Esto conlleva a la lesión celular y la estimulación de procesos inflamatorios que inducen cambios en el crecimiento y la señalización celular que pueden conducir al desarrollo del cáncer. En relación con el hígado, las investigaciones realizadas en los últimos años principalmente han estudiado la toxicidad del cadmio, el mercurio, el hierro y el cobre y los efectos protectores de la melatonina en la intoxicación con estos metales¹⁷⁸.

Sepsis

La disfunción hepática y sobretodo la disfunción mitocondrial durante la sepsis están estrechamente relacionados con una alta mortalidad en los pacientes sépticos. Durante la sepsis, la respuesta inflamatoria iniciada por la oxidación lipídica conduce a la

liberación de TNF e IL y provoca alteraciones mitocondriales. Esto conduce a una reducción de la producción de ATP debido a un consumo masivo de NADH. Además las citoquinas proinflamatorias que se generan durante la sepsis inhiben la expresión de la piruvato deshidrogenasa, que reduce los sustratos para la fosforilación oxidativa, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno con una caída adicional de la producción de ATP. Durante la sepsis, la acción de la enzima óxido-nítrico-sintasa provoca una elevación significativa de los niveles de NO^- . El NO reacciona con el oxígeno generando peroxinitritos (ONOO^-), lo cual termina en una supresión de la respiración mitocondrial, de la síntesis de ATP y en un daño mitocondrial. Todos estos procesos se manifiestan en una gran variedad de respuestas biológicas incluyendo hipotensión y shock séptico¹⁷⁸.

La melatonina se ha ensayado como tratamiento de la sepsis, con resultados alentadores. La melatonina (10-60 mg/kg/i.p) reduce la oxidación lipídica en ratas a las cuales se les ha administrado lipopolisacaridos como agentes inflamatorios¹⁸⁸. Por otra parte, en la insuficiencia multiorgánica debida a la sepsis, la melatonina (10 mg/kg/i.p) redujo la lipooxidación, aumentando la actividad de enzimas antioxidantes (glutathione), y mejorando así la disfunción hepática¹⁸⁹. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wu et al.¹⁹⁰ En este estudio se administró melatonina a ratas sépticas. Observándose la reducción en plasma de la concentración de IL-1 β y NO^- , reduciendo la infiltración de polimorfonucleares (PMN) en el hígado.

3.2.6.2. La melatonina como terapia sobre el daño hepático producido por isquemia-reperfusión

El fenómeno de isquemia-reperfusión es una causa importante de daño hepático durante los procedimientos quirúrgicos que implican resección hepática o trasplante hepático. Se trata de un fenómeno difásico donde las células hepáticas son dañadas por la hipoxia y por la falta de estímulos biomecánicos. Este daño se acentúa tras la restauración de la llegada de oxígeno y de los estímulos biomecánicos¹⁹¹.

Las lesiones del injerto hepático durante la isquemia-reperfusión siguen siendo una complicación grave en la práctica clínica, a pesar de las investigaciones para solventar el problema. Las lesiones por isquemia-reperfusión es la principal causa de disfunción primaria del injerto hepático, siendo la causa del 81% de retrasplantes durante la primera semana después de la cirugía¹⁹².

Un gran número de factores y mediadores intervienen en la lesión de isquemia-reperfusión. Las relaciones entre las vías de señalización implicadas son muy complejas y todavía no es posible describir, con absoluta certeza, los eventos que ocurren desde el comienzo de la perfusión y el final. Se conoce que existe un aumento de ROS, de óxido nítrico, de algunos mediadores proinflamatorios como el TNF y de la transcripción de factores, por ejemplo factor nuclear kappa B (nFkB). Además existe una participación de las células de Kupffer y de las células endoteliales sinusoidales hepáticas. Todo ello conlleva a la muerte celular y en última instancia, a la disfunción hepática¹⁹².

Isquemia

La mayoría de los cambios tempranos en los hepatocitos anóxicos se producen en las mitocondrias. La falta de oxígeno, como portador de electrones para la cadena respiratoria mitocondrial, interrumpe inmediatamente el flujo de electrones, reduciendo la actividad de la cadena respiratoria. Dado que las mitocondrias ya no están aceptando electrones, se produce una reducción de nucleótidos piridina, lo que resulta en el aumento intracelular de la relación NADH/NAD⁺. Esto conduce a la depleción de ATP intracelular de ATP, a la aceleración de la glucólisis, al aumento de la formación de lactato, y a la alteración de la homeostasis de hidrógeno, sodio y calcio. La isquemia también conduce a un considerable aumento del AMP cíclico, que es un factor importante en el metabolismo de la glucosa. El AMPc, a través de la acción de la proteína AMPc kinasa, conduce a la fosforilación y desbalance de enzimas que participan en el control del metabolismo de hidratos de carbono¹⁹¹.

ROS

La lesión por reperfusión se deriva principalmente de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas tras la reintroducción de oxígeno a los tejidos isquémicos. Los ROS se producen a nivel intracelular como extracelular, siendo la mitocondria su fuente de producción principal en las células hepáticas¹⁹¹. Aunque se han postulado los inhibidores de la xantina y xantina oxidasa (X/XOD) como el alopurinol, el principal sistema de generación de ROS en el hepatocito. También se ha postulado que el aumento del estrés oxidativo vascular después de 30 y 60 minutos de isquemia fue atenuado por la inactivación de las células de Kupffer. Otros estudios han demostrado que, o bien los neutrófilos, o bien las células de Kupffer son la principal fuente de ROS¹⁹².

NO

La lesión hepática en el fenómeno de isquemia-reperfusión se debe a la interrupción de la sangre dentro de los sinusoides debido a la contracción de la célula estrellada. La endotelina 1 (ET-1) provoca dicha contracción, y el NO producen su relajación. Se ha sugerido que la lesión por isquemia-reperfusión es el resultado de un desequilibrio entre la ET y los niveles de NO durante el período de reperfusión. En las primeras etapas de la reperfusión hepática, la concentración de ET se incrementa en plasma y en parénquima hepático, lo cual da lugar a una disminución del flujo de sangre en el hígado. En las primeras etapas de la reperfusión hepática, la concentración de ET se incrementa en plasma y parénquima hepático, y esto se ha correlacionado con una disminución del flujo de sangre hepático. Por otra parte, las concentraciones de NO son bajas durante las primeras horas de reperfusión. Este bajo nivel de NO es debido a los bajos niveles intracelulares de NADPH y oxígeno (cofactores necesarios para la síntesis de NO) después del período de isquemia y a la liberación de una gran cantidad de arginasa, que descompone la L-arginina (precursor requerido para la síntesis de NO) y la agota en 30 minutos tras el inicio de la reperfusión. La producción significativa de NO no ocurre hasta 6 horas después del inicio de la reperfusión, ya que esto requiere la inducción de la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS) que tarda de 4 a 6 horas. De aquí podemos concluir que el hígado podría beneficiarse de tratamientos

farmacológicos para potenciar las concentraciones de NO inmediatamente se inicie el período de reperfusión¹⁹³. Sin embargo existen dos isoformas de NOS, una endotelial (eNOS), y otra inducible (iNOS). eNOS se expresa exclusivamente en las células endoteliales sinusoidales y liberan pequeñas cantidades de NO en intervalos cortos. Por el contrario, iNOS sintetiza grandes cantidades de NO en intervalos sostenidos y se encuentra en todos los hepatocitos, células endoteliales, células de Kupffer y células estrelladas. Algunos estudios sugieren que la isoforma endotelial tiene un efecto protector en la lesión isquemia-reperfusión y que la isoforma inducible puede contribuir a incrementar la lesión. Esto puede depender de la cinética de las dos isoformas. En condiciones basales, un nivel bajo de generación de NO por la isoforma eNOS puede mejorar la microcirculación del injerto y la reperfusión. Por el contrario, NO derivado de iNOS no se puede generar hasta varias horas después de la estimulación debido a los requisitos para la transcripción de esta isoforma. Además, la producción excesiva de NO derivado de iNOS puede ser perjudicial a través de la generación de derivados de NOS superóxidos o la generación de peroxinitritos¹⁹².

Citoquinas

Las citoquinas inician y mantienen la respuesta inflamatoria que ocurre durante el período de reperfusión. El deterioro del flujo sanguíneo durante la reperfusión precoz induce la producción de un gran número de mediadores de la inflamación, incluyendo citoquinas, quimiocinas y eicosanoides. El TNF y la IL-1 son las dos citoquinas más comúnmente implicadas en el daño isquemia-reperfusión. TNF- α y IL-1 tienen potentes acciones inflamatorias. Ambas citoquinas inducen la síntesis de IL-8 y regulan la expresión de moléculas de adhesión, dando lugar a un aumento de leucocitos en el sinusoide y a interacciones endoteliales de las células, lo cual se traduce en una mayor producción de citoquinas. TNF- α activa y ejerce un papel importante en la quimiotaxis de neutrófilos. TNF- α también es capaz de inducir a las células de Kupffer a que generen radicales superóxido. IL-1 induce a las células de Kupffer a la producción de TNF- α y aumenta la producción de radicales libres por los neutrófilos. El aumento de la expresión de TNF- α y de IL-1 se observa a los 5 minutos desde el inicio de la reperfusión e IL-1 se mantiene 2 horas después de la reperfusión del injerto. El papel de las dos citoquinas en el daño hepático por isquemia-reperfusión se ve confirmado por

experimentos que muestran que su neutralización por antisuero, anticuerpos monoclonales y antagonistas del receptor, disminuye la gravedad de la lesión por reperusión, como lo demuestra la disminución de la infiltración de neutrófilos¹⁹³.

Los niveles del factor de activación plaquetaria (PAF) aumentan significativamente después de 12 horas de reperusión y llegan a un punto máximo después de 24 horas de reperusión, en el momento de máxima lesión hepática. De hecho, la inyección preisquémica de un antagonista del PAF mejora el flujo sanguíneo y la función hepática.

La producción de PAF es probablemente el resultado de la interacción entre las células de Kupffer y los radicales libres de oxígeno¹⁹³. Zhou et al.¹⁹⁴ demostraron que tanto la inactivación de las células de Kupffer con cloruro de gadolinio y la inhibición de la formación de radicales libres de oxígeno con alopurinol, redujo la producción de PAF en el hígado. En el futuro, antagonistas del PAF pueden resultar útiles ante la escasez de donantes de hígado, ya que tienen demostrado que reducen la peroxidación lipídica y mejoran la función del aloinjerto hepático porcino donante¹⁹³.

Células de Kupfer

Las células de Kupffer son macrófagos localizados en el hígado formando parte de los sinusoides y forman parte del sistema retículo-endotelial. Cuando tiene lugar la activación de las células de Kupffer, se generan una gran cantidad de mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas y radicales libres de oxígeno. Desempeñan un papel importante en la patogénesis de la lesión hepática isquemia-reperusión. Su activación parece que tiene lugar durante la primera etapa de reperusión¹⁹⁵. La administración de cloruro de gadolinio o con palmitato de metilo (que suprime la actividad de las células de Kupffer) atenuó la lesión hepática por reperusión y la administración de partículas de látex, o altas dosis de retinol o con *Propionibacterium acnés* (que aumentan la actividad de las células de Kupffer) agravó la lesión. También se ha demostrado que la solución de preservación de la Universidad de Wisconsin disminuye la actividad de las células de Kupffer en modelos de trasplante hepático porcino.

Células endoteliales sinusoidales

A pesar de que la lesión de las células endoteliales sinusoidales del hígado (CESH) en la lesión por isquemia-reperfusión se describieron a finales de 1980, sólo unos pocos grupos de investigación han dedicado sus esfuerzos para comprender mejor la fisiopatología de las CESH durante la isquemia-reperfusión¹⁹¹. Rauen et al.¹⁹⁶ demostraron que las CESH tras la exposición a la isquemia fría y a la reperfusión, aumentaban notablemente los niveles de especies reactivas de oxígeno, lo que finalmente conducía a la disminución de la viabilidad de las CESH (Fig.31).

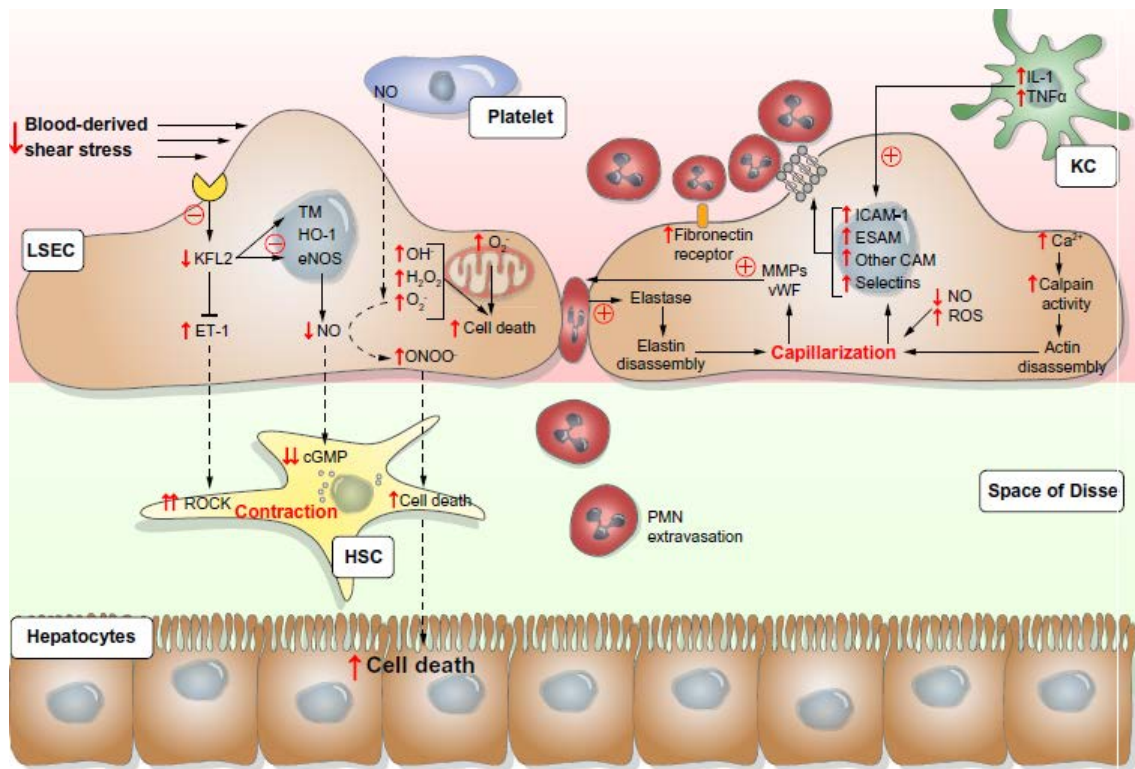


Fig.31. Interacciones de las células endoteliales y de las células sinusoidales durante el daño hepático por isquemia-reperfusión.

Neutrófilos

Los neutrófilos contribuyen a la lesión por reperfusión mediante la liberación de radicales libres de oxígeno y proteasas. Aunque los neutrófilos comienzan a acumularse en el hígado durante el período de reperfusión temprano, no se activan hasta pasadas 5 horas del inicio de la reperfusión¹⁹³. Jaeschke et al.¹⁹⁷ demostraron que el uso de anticuerpos monoclonales contra los neutrófilos protegió el hígado de rata de la lesión por reperfusión.

Un proceso con múltiples pasos, mediado por una variedad de moléculas de superficie celular permiten la adhesión de los neutrófilos a las células sinusoidales endoteliales. Se produce la interacción entre los receptores β -2-integrinas presentes en el neutrófilo y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) de las células endoteliales sinusoidales. Esta interacción da lugar a la migración de PMN a la circulación. El aumento de expresión de ICAM-1 en células epiteliales normales y en células endoteliales puede ser inducido por diferentes agente proinflamatorios tales como TNF- α e IL-1. Por lo tanto, la isquemia-reperfusión conduce a un aumento de la expresión de ICAM-1 en el hígado¹⁹³. En ratas, los anticuerpos anti-ICAM-1 se han utilizado eficazmente para atenuar la lesión hepática después del trasplante hepático ortotópico. Debido a que en el trasplante de hígado humano ICAM-1 se expresa en una etapa muy temprana después de la reperfusión del hígado del donante, y se correlaciona fuertemente con el rechazo precoz agudo, dicho tratamiento puede resultar prometedor en la reducción del número de episodios de rechazo¹⁹³.

Factor nuclear κ B

Un nexo común entre la mayoría de los mediadores del daño hepático isquemia-reperfusión es la regulación de la transcripción de citoquinas (TNF- α), quimiocinas, moléculas de adhesión (ICAM-1) por NF- κ B. El NF- κ B es un factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas y transmite señales a la maquinaria de transcripción en el núcleo mediante la unión a sitios κ b de regiones reguladoras del ADN. Sus propiedades de transcripción están estrechamente controladas por las proteínas inhibitoras κ B. En la presencia de estrés oxidativo, estas proteínas

inhibidoras están degradadas, lo cual permite la translocación de NF- κ B al núcleo¹⁹³. Recientes experimentos en modelos de rata y ratón han demostrado que NF- κ B aumenta notablemente después de 30-60 minutos de reperfusión, y disminuye después de 4-5 horas de reperfusión. El aumento de este factor nuclear condiciona un aumento de especies reactivas de oxígeno, TNF- α e ICAM-1. En un modelo de rata, el NF- κ B fue inhibido por el antioxidante N-acetilcisteína, lo que sugiere que la activación de NF- κ B durante el daño hepático isquemia-reperfusión está mediado por especies reactivas de oxígeno¹⁹³.

El papel de la melatonina en el daño hepático por isquemia-reperfusión

La melatonina, una molécula con importantes propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, protege del daño isquemia-reperfusión en varios órganos, incluidos el corazón, el cerebro y el riñón¹⁹⁸. En 1996, Sewerynek et al. demostraron por primera vez los efectos protectores de la melatonina en la lesión de isquemia-reperfusión en el hígado¹⁹⁸. Hernández et al.¹⁹⁸ concluyeron que la melatonina reduce el daño hepático asociado con los fenómenos inflamatorios del tejido hepático tras la isquemia-reperfusión. Sener et al.¹⁹⁹ compararon los efectos de la melatonina con N-acetilcisteína y concluyeron que la melatonina es superior a la N-acetilcisteína en la reducción del daño hepático por isquemia-reperfusión. Kang et al.²⁰⁰ demostraron que el tratamiento con melatonina redujo la expresión de genes pro-apoptóticos y pro-inflamatorios en la isquemia-reperfusión del hígado de rata. Finalmente Kang et al. concluyeron que la melatonina era una molécula hepatoprotectora a través de los mecanismos que implican la inhibición de la NF- κ B y las vías de regulación de la proliferación celular.

A continuación se describe el efecto antioxidante de la melatonina ante dos procesos patológicos ocurridos durante el daño hepático en la isquemia-reperfusión: la disfunción endotelial y la disfunción mitocondrial.

En cuanto a la disfunción endotelial (Fig.32), Rodríguez-Reynoso et al.²⁰¹ demostraron que la melatonina exógena reduce las concentraciones de TNF- α y la inhibición de la expresión de iNOS. La melatonina aumentó los niveles de mRNA de la eNOS, mientras que se reduce la elevación de los niveles de mRNA de iNOS.

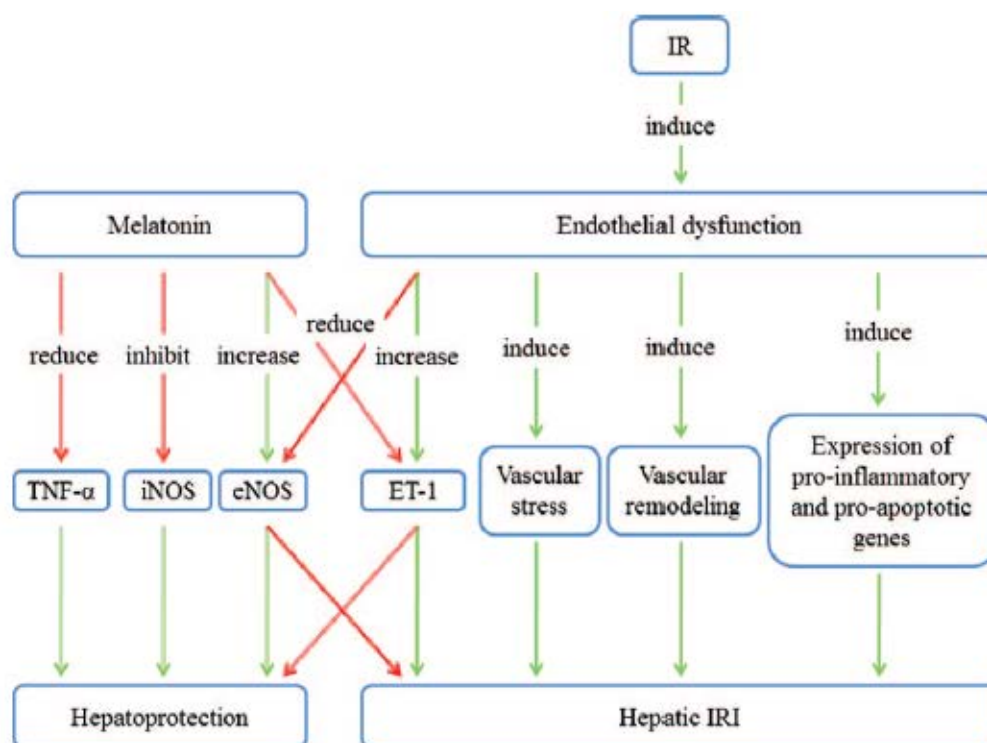


Fig.32. Relación entre la melatonina y la disfunción endotelial en el daño isquemia-reperfusión. La melatonina ejerce su acción hepatoprotectora inhibiendo iNOS, estimulando eNOS y regulando TNF- α y ET-1. La disfunción endotelial conduce al estrés vascular y a la expresión de genes proinflamatorios y pro-apoptóticos, empeorando así el daño por isquemia-reperfusión. eNOS: endotelial NO sintasa. ET-1: endotelina-1. iNOS: inducible NO sintasa. TNF- α : factor de necrosis tumoral α . IRI: daño isquemia-reperfusión.

La melatonina ha demostrado preservar la fisiología mitocondrial en condiciones de estrés oxidativo. La melatonina consigue mantener el ciclo respiratorio y la síntesis de ATP en condiciones de estrés oxidativo, mediante la reducción de la fuga de electrones.

La melatonina protege contra el daño hepático producido por la isquemia-reperfusión mediante numerosas vías de señalización, incluyendo la vía de la hemooxigenasa (HO-1), toll-like receptor 4 (TLR-4) y c-Jun N- terminal quinasa (JNK)¹⁹⁸ (Fig.33).

La hemooxigenasa, es una enzima implicada en la degradación del grupo hemo, cuyo resultado es la formación de CO, biliverdina y hierro libre. HO-1 es la forma inducible de la enzima. La inducción de HO-1 conlleva un efecto protector sobre los procesos

inflamatorios y oxidativos de los tejidos cuando se activa ante situaciones de estrés oxidativo, jugando un papel importante en el daño isquemia-reperfusión por sus funciones antioxidantes y antiinflamatorias. La melatonina ejerce una inhibición sobre la HO-1, la cual ejerce a su vez una serie de reacciones de inhibición sobre diferentes moléculas implicadas en el daño hepático, como son las enzimas quinasa de Janus (JAK), el receptor toll asociado a activador de interferón (TRIF), interferón β (IFN- β), la citoquina CXCL-10, el factor de diferenciación mieloide (MyD88); consiguiendo finalmente un efecto hepatoprotector ante el daño hepático en la isquemia-reperfusión¹⁹⁸.

La inhibición de MyD88 supone un efecto de atenuación sobre TLR4, el cual a su vez suprime la actividad de NF- κ B, consiguiendo el efecto hepatoprotector ante la isquemia-reperfusión. Los receptores tipo Toll (o Toll-like receptor TLRs) constituyen una familia de proteínas que forman parte del sistema inmunitario innato. Estos receptores son transmembranosos y reconocen patrones moleculares expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos, y estimulan una variedad de respuestas inflamatorias¹⁹⁸.

La otra vía por la cual la melatonina ejerce un papel hepatoprotector, es actuando directamente sobre JNK, inhibiéndolo. Las quinasas c-Jun N-terminal (JNKs), originalmente identificadas como quinasas que unen y fosforilan a la proteína c-Jun, son quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que responden a estímulos de estrés, como citoquinas, radiación ultravioleta, choque térmico y choque osmótico, y se encuentran implicadas tanto en el proceso de diferenciación de los linfocitos T, como en procesos de apoptosis¹⁹⁸.

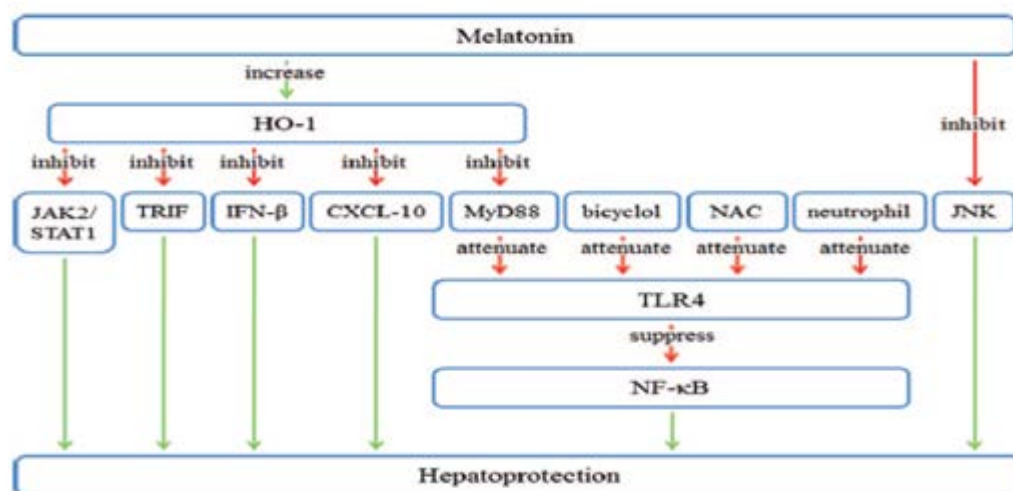


Fig.33. Vías de actuación de la melatonina en el daño hepático por isquemia-reperfusión. La melatonina incrementa HO-1 e inhibe JNK. HO-1 inhibe JAK2/STAT1, TRIF, IFN- β , CXCL-10 y MyD88. Biciclol, NAC, neutrófilos y MyD88 atenuan TLR-4. La atenuación de TLR-4 lleva a la supresión de NF- κ B. Todas estas reacciones conllevan una situación de hepatoprotección.

CXCL-10: C-X-C motif ligando 10. HO-1: hemo-oxigenasa 1. IRI: daño por isquemia-reperfusión. JAK2: Janus kinasa 2. JNK: c-Jun N-terminal-kinasa. MyD88: factor de diferenciación mieloide 88. NAC: N-acetil-cisteína. NF- κ B: factor nuclear κ B. STAT1: señal transductora y activador de la transcripción 1. TLR-4: toll-like receptor 4. TRIF: receptor toll asociado al activador de interferón.

La melatonina ha demostrado sus efectos hepatoprotectores en el daño producido por la isquemia-reperfusión mediados por las diferentes vías moleculares citadas anteriormente, en diferentes modelos experimentales. Zamzami et al. demostraron en 1997 en un modelo de rata (utilizando ratas Wistar albinas) que la melatonina y la N-acetil-cisteína tienen efectos beneficiosos contra el daño hepático por isquemia-reperfusión y tienen efectos sinérgicos cuando se administran en combinación, ejerciendo una mayor protección hepática¹⁹⁸. Okatani et al. demostraron en 2003 en un modelo de rata (ratas macho Sprague-Dawley) efectos beneficiosos de la melatonina a nivel mitocondrial, reduciendo la peroxidación lipídica mitocondrial, la estructura mitocondrial, los cambios de pH y por lo tanto, la actividad respiratoria mitocondrial¹⁹⁸. En 2009, Liang et al.²⁰² realizaron un experimento en ratas hembras adultas (Sprague-Dawley) observando un aumento de la supervivencia en animales tratados, además de una disminución de los niveles de transaminasas, índices de necrosis, daño hepático, infiltración leucocitaria y expresión de iNOS. A nivel molecular se observó una

disminución de actividad de JNK en los animales tratados con melatonina. En 2011 Kang et al.²⁰⁰ realizaron un estudio experimental en ratas machos raza Sprague-Dawley, concluyendo que la melatonina disminuye los niveles de expresión de TLR4 y TRIF; disminuye TNF- α , IL-5, iNOS, IFN- β , MyD88, JNK y aumentó el nivel de HO-1. Hernández et al.¹⁹⁸ experimentaron en 2011 con ratas jóvenes y ancianas Wistar y Zucker, observando en sus resultados un incremento en plasma de transaminasas, citoquinas y productos de estrés oxidativo en las ratas sometidas a isquemia-reperfusión (dicha elevación fue mayor en ratas viejas y Zucker). El tratamiento con melatonina significativamente redujo el daño hepático, siendo la administración oral más efectiva que la intraperitoneal.

En conclusión, la melatonina es un fármaco prometedor contra la reducción de los daños tras la isquemia-reperfusión. En los últimos estudios se han observado gran cantidad de vías de señalización a nivel molecular sobre las que actúa la melatonina y que, proporcionan muchas líneas de investigación y nuevas estrategias para tratar el actual problema de las lesiones hepáticas tras isquemia-reperfusión²⁰³, que acentúa la problemática mundial de escasez de órganos para la donación^{198,204,205}.

3.2.6.3. La melatonina como terapia sobre el hígado graso alcohólico (EHH)

La enfermedad hepática alcohólica (EHH) es una consecuencia médica común del abuso crónico de alcohol. La tasa de mortalidad por esta enfermedad alcanza el 5-6% en EEUU y Europa Occidental, siendo la novena causa de muerte en estas sociedades. La EHH puede evolucionar hacia hepatitis alcohólica, cirrosis y carcinoma hepatocelular.

Los marcadores de la peroxidación lipídica se incrementan en pacientes con EHH y contribuyen a la progresión del daño hepático alcohólico, induciendo la fibrosis y la carcinogénesis. La ingesta excesiva de etanol promueve la formación de ROS en las mitocondrias y disminuye GSH mitocondrial, lo cual provoca cambios en el ADN mitocondrial²⁰⁶.

Hu et al.²⁰⁷ observaron en un modelo de rata, que la melatonina a dosis de 10-20 mg/kg redujo los marcadores de estrés oxidativo que incluye MDA y el aumento de las enzimas antioxidantes hepáticas (SOD y GPx). Además la melatonina redujo la expresión de algunas citoquinas proinflamatorias y la infiltración de neutrófilos.

El alcohol produce alteración de la homeostasis de las endotoxinas, aumentando la absorción en el intestino de derivados de endotoxinas. Las endotoxinas estimulan la producción de TNF- α , la IL-10, ROS y prostanoides, que modulan la presentación de antígenos por células presentadoras de antígenos y suprimen la actividad de células T²⁰⁶.

La matriz extracelular también se altera durante la ingesta de alcohol, debido a la lesión hepática por las enzimas llamadas metaloproteinasas de la matriz (MMPs), que aumentan durante el consumo de alcohol. La actividad de MMP está regulada por el inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP). MMP-2 y MMP-9 están involucradas en la degradación de los componentes de la membrana basal, tales como el colágeno IV y la fibronectina. Además, ROS puede inducir la expresión de MMP-9 a través de la vía TNF- α . Se ha observado que durante la regeneración del hígado, MMP-9 activa el factor de crecimiento de hepatocitos y promueve la progresión de la proliferación celular²⁰⁶. Mishra et al.²⁰⁸ observaron en un modelo de rata que la melatonina a dosis de 15 mg/kg reduce la actividad de MMP-9 casi hasta los niveles normales y la expresión de TNF- α .

Las mitocondrias sufren un daño importante debido a la toxicidad por etanol, produciéndose una degradación y depleción de DNA mitocondrial. Mansouri et al.²⁰⁹ analizaron el ADN mitocondrial en un modelo de roedor (rata Swiss) tras la exposición a etanol aguda intragástrica (5 g/kg) en diferentes órganos (cerebro, corazón, músculo esquelético e hígado) y probaron los beneficios de la melatonina. Observaron que el aumento de ROS (especies reactivas de oxígeno) provocados por el metabolismo del etanol juega un importante papel en el deterioro del ADN mitocondrial. La melatonina impide eficazmente ese daño, no sólo en el hígado, también en el cerebro, en el corazón y en el músculo-esquelético.

El metanol, un derivado de la familia de los alcoholes, se oxida a formaldehído en el hígado y luego a ácido fórmico (que es el principal responsable de la inhibición tóxica

de citocromo c oxidasa) y dióxido de carbono debido a la acción de la alcohol deshidrogenasa y otras vías. Kurcer et al.²¹⁰ en un modelo de rata, observó que la intoxicación por metanol aumenta el MDA, la carbonilación de proteínas, los niveles de nitrito y la actividad MPO. Estos cambios fueron acompañados por una significativa reducción de la enzima GPx, SOD y CAT. Todos estos cambios inducen el daño de los hepatocitos. Todas estas alteraciones mejoraron de manera significativa con la administración de melatonina (10 mg/kg/día/ intraperitoneal). También se observó una mejoría a nivel de los hallazgos histopatológicos. Los efectos protectores de la melatonina en la toxicidad por etanol han sido comparados con la N-acetil-cisteína, que produce sus acciones antioxidantes indirectamente al facilitar la síntesis de GSH que reacciona con los radicales libres. Los autores concluyen que el daño hepático debido a la intoxicación por metanol se mejora tras la administración de melatonina o N-acetil-cisteína, pero los resultados fueron mejores cuando se utilizó melatonina. Esto puede ser el resultado de su mayor eficacia en la eliminación de los radicales libres y su capacidad para estimular las enzimas antioxidantes.

3.2.6.4. La melatonina como terapia sobre el hígado graso no alcohólico o esteatohepatitis no alcohólica (NAFLD)

Datos recientes muestran que la NAFLD es una manifestación hepática del síndrome metabólico que se asocia con la resistencia a la insulina y abarca un grupo de trastornos tales como la obesidad, la dislipemia, la diabetes mellitus tipo II y la hipertensión. En la actualidad, la terapia tiene como objetivo modificar los factores de riesgo pero no existen terapias probadas para la prevención o el tratamiento de la EHNA²¹¹.

El estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos son el mecanismo fisiopatológico principal en el hígado graso no alcohólico. Algunos estudios han demostrado que el deterioro de los mecanismos antioxidantes de defensa puede ser un factor importante en la patogénesis del hígado graso no alcohólico. Por lo tanto, un enfoque terapéutico en esta enfermedad podría dirigirse a mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes.

Los efectos beneficiosos de la melatonina que se han estudiado en la NAFLD son los siguientes (Fig. 34):

- Efecto antioxidante: scavenger de radicales libres, aumento de enzimas antioxidantes, etc.
- Efecto antiinflamatorio: disminución de citoquinas e interleuquinas proinflamatorias.
- Efecto anti-hiperlipidémico.
- Efecto citoprotector: disminución de enzimas hepáticas de citólisis.

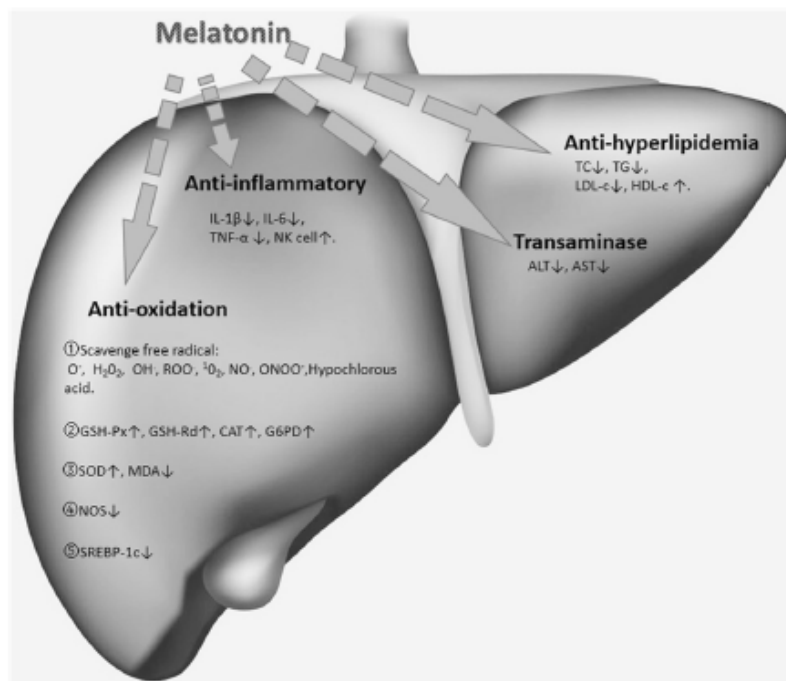


Fig.34. Posibles mecanismos de acción de la melatonina en la enfermedad hepática no alcohólica.

Pan et al.²¹² publicaron en 2006 el único estudio que demuestra los efectos protectores sobre el hígado graso inducido. Realizaron el estudio en un modelo animal de roedores y administraron la melatonina por vía intraperitoneal, con una dosis de 2.5, 5 y 10 mg/kg/día durante 12 días. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la melatonina sobre la función hepática, la lesión hepática, el metabolismo lipídico y el estrés oxidativo en ratas con hígado graso no alcohólico inducido por dieta alta en

grasas. El estudio se realizó sobre 50 ratas tipo Wistar que se dividieron en cinco grupos: grupo I fue el control tratado con dieta estándar de laboratorio, grupo II fue tratado con dieta alta en grasa, grupo III, IV y V fue tratado con dieta alta en grasas y se inyectó melatonina por vía intraperitoneal en una dosis de 2.5, 5 y 10 mg/kg/día respectivamente. El daño hepático se evaluó mediante evaluación de lípidos en suero y en hígado. El estrés oxidativo y la peroxidación lipídica fueron evaluados mediante la medición de MDA y la actividad de enzimas antioxidantes como GPx en hígado. En el presente estudio, las ratas alimentadas con dieta alta en grasas, desarrollan de manera significativa esteatosis hepática y esteatohepatitis, así como elevación de AST, ALT, colesterol, triglicéridos. Los resultados mostraron que la melatonina (5 o 10 mg/kg/día) fue eficaz en la reducción de la esteatosis hepática, por la reducción en suero de ALT, AST, colesterol, triglicéridos.

Además, la melatonina (2.5, 5 y 10 mg/kg/día) aumentó las enzimas antioxidantes hepáticas SOD y GSH-Px. Los 10 mg/kg/día de melatonina reduce los niveles de MDA en hígado. El efecto de la melatonina como hipolipemiente se atribuye al aumento del catabolismo del colesterol, los ácidos biliares, la inhibición de la síntesis de colesterol y acciones directas en el tejido adiposo a través de receptores específicos MT1 y MT2. Las dosis moderadas o altas de melatonina redujeron los niveles de colesterol hepático, mientras que sólo una alta dosis redujo los triglicéridos hepáticos.

Estos hallazgos demuestran un efecto en el lipometabolismo hepático dosis-dependiente. En resumen, este estudio demuestra que la melatonina ejerce un efecto protector en el hígado graso en ratas inducidos por dietas ricas en grasas probablemente a través de su acción antioxidante e hipolipemiente.

Hatzis et al.²¹³ publicaron en 2013 un estudio similar al anterior, utilizando un modelo de roedores. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la melatonina (intraperitoneal) en la prevención del estrés oxidativo al que se ha inducido un hígado esteatósico mediante dieta alta en grasas. En este estudio, los investigadores utilizaron 78 ratas que fueron randomizadas a 6 grupos de trabajo.

Grupo 1 (grupo control): ratas alimentadas con dieta alta en grasas durante 4 semanas (subgrupo 1A) u 8 semanas (subgrupo 1B).

Grupo 2: ratas que fueron alimentadas con dieta normal más 5 mg/kg/día de melatonina durante 4 semanas (subgrupo 2A) u 8 semanas (subgrupo 2B).

Grupo 3: ratas que fueron alimentadas con dieta normal más 10 mg/kg/día de melatonina durante 4 semanas (subgrupo 3A) u 8 semanas (subgrupo 3B).

Grupo 4: ratas que fueron alimentadas con dieta esteatósica más 5 mg/kg/día de melatonina durante 4 semanas (subgrupo 4A) u 8 semanas (subgrupo 4B).

Grupo 5: ratas que fueron alimentadas con dieta esteatósica más 10 mg/kg/día de melatonina durante 4 semanas (subgrupo 5A) u 8 semanas (subgrupo 5B).

Grupo 6: ratas que fueron alimentadas con dieta esteatósica durante 8 semanas (subgrupo 6A) o 12 semanas (subgrupo 6B) más melatonina en las últimas 4 semanas.

Se analizaron los siguientes parámetros: peso del hígado, peso del hígado ajustado por peso de la rata, presión portal, marcadores lipídicos en plasma (colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos), marcadores de daño hepático en plasma (AST, ALT), histología hepática (grados de esteatosis), indicadores de estrés oxidativo (MDA y enzima glutatión). Los resultados fueron prometedores y estadísticamente significativos para varios parámetros. Las ratas que recibieron melatonina en una dosis de 5 o 10 mg/kg tuvieron un peso hepático y un peso hepático ajustado a peso corporal menor que las que no recibieron melatonina. Todas las ratas a las que se había alimentado con dieta alta en grasas y que no recibieron melatonina, desarrollaron un grado III de esteatosis. Sin embargo, a las ratas que se les administró dieta esteatósica más melatonina tuvieron menos esteatosis: con 5 mg/kg de melatonina, desarrollaron grado III sólo el 11,1% (3 de 27), y con 10 mg/kg de melatonina, desarrollaron grado III sólo el 3,4% (1 de 29). No se pudo demostrar la efectividad de la melatonina en la reducción de ninguno de los marcadores lipídicos bioquímicos en suero, los resultados no fueron significativos comparando los grupos que recibieron melatonina con los que no recibieron. La necrosis celular hepática fue significativamente menor en las ratas que habían recibido dieta rica en grasas y melatonina comparándola con las que no habían recibido melatonina, ya que las cifras de ALT y AST fueron significativamente menores.

También se pudo demostrar que la melatonina atenuaba el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica, ya que los niveles de MDA fueron significativamente menores y los niveles de glutatión significativamente mayores en el grupo de ratas tratadas con melatonina respecto a las ratas no tratadas. La disminución de MDA se observó en ratas a las que se administró una dieta esteatósica acompañada de la dosis de melatonina, pero no fue así en las ratas que se alimentaron de dieta esteatósica y sólo en las últimas 4 semanas se administró dieta esteatósica más melatonina. Además este último grupo de ratas a las que se dio melatonina sólo en las últimas 4 semanas de dieta esteatósica, desarrollaron todas una esteatosis hepática grado III. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en estudios anteriores. Los autores concluyen que la melatonina tiene un efecto beneficioso sobre la esteatosis pero sus beneficios disminuyen en una fase tardía de la esteatosis hepática, donde observaron un fracaso para revertir o reducir la gravedad del proceso.

Hoyos et al.²¹⁴ publicaron en 2010 otro modelo experimental en roedor. En este trabajo se estudiaron parámetros del metabolismo del colesterol, de función hepática y de daño oxidativo de la membrana plasmática (MDA+4-HDA). Se realizaron 4 grupos de ratas: un grupo de ratas alimentadas con dieta regular a las que no se administró melatonina (grupo control), otro grupo de ratas fueron alimentadas con dieta regular y se les administró melatonina, otro grupo fueron alimentadas con dieta enriquecida con colesterol y no se les administró melatonina, y el último grupo de ratas fueron alimentadas con dieta enriquecida con colesterol y se les administró melatonina. La melatonina se administró vía oral, utilizándose el agua de beber. Las dosis de melatonina utilizada fue de 10 mg/L de agua durante 3 meses. En cuanto al metabolismo lipídico, sólo se encontraron diferencias en el grupo tratado con melatonina y sometido a dieta rica en colesterol, que disminuyeron los niveles de colesterol total y de LDL. La melatonina también previno en este grupo el descenso del nivel de HDL. Los parámetros de función hepática no se modificaron en el grupo tratado con melatonina. La dieta rica en colesterol no modificó los valores de MDA+4-HDA, sin embargo el tratamiento con melatonina sí que disminuyó los niveles de MDA+4-HDA en el hígado, cerebro y bazo. Los autores del estudio concluyen que la melatonina participa desde un punto de vista fisiológico en la regulación del metabolismo del colesterol y en la prevención del daño oxidativo de las membranas.

Chen et al.²¹⁵ publicaron en 2011 los resultados de su estudio sobre el efecto de la melatonina en la acumulación de lípidos hepáticos inducida por lipopolisacárido o endotoxina (potente tóxico estimulante del sistema inmune, componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas) en un modelo de roedor. Este estudio muestra que una dosis única de lipopolisacárido aumentó significativamente el contenido de triglicéridos y lípidos hepáticos en ratones. Posteriormente se demostró que se activó la proteína de unión al elemento regulador del esteroide hepático (SREBP-1c) en los ratones tratados con lipopolisacárido y dos genes diana de SREBP-1c. La melatonina atenuó significativamente la activación de SREBP-1c inducida por lipopolisacárido y la expresión de los genes diana de SREBP-1c. Además la melatonina redujo los niveles en suero de triglicéridos hepáticos. Según los autores, la melatonina puede ser útil como fármaco para proteger contra la acumulación de lípidos hepáticos en la NAFLD provocado por endotoxina.

En 2009 se publicó otro estudio experimental en roedor (Tahan et al.)²¹⁶ en el cual se indujo NASH en ratas mediante una dieta deficiente en metionina y colina (MCDD). Se dividieron las ratas en cuatro grupos. Dos grupos fueron alimentados con MCDD, a uno de ellos se les administró melatonina a dosis de 50 mg/kg/día vía intraperitoneal durante 1 mes y al otro no. Los otros dos grupos fueron alimentados con dieta control, a uno se le administró melatonina y al otro no. Se midieron marcadores de estrés oxidativo en tejido hepático (MDA, GSH, SOD), parámetros serológicos (ALT, AST, B, colesterol total, TG), citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) y apoptosis de hepatocitos (fragmentación del DNA). La melatonina disminuyó AST, ALT Y FA en el grupo de MCDD y melatonina, comparado con el grupo de MCDD solo. No hubo variación en los niveles de bilirrubina y albúmina. MDA también fue superior en el grupo MCDD con respecto al grupo MCDD+ melatonina y también con respecto a los otros dos grupos. Los niveles de enzimas antioxidantes (GSH y SOD) fueron inferiores en el grupo MCDD con respecto al grupo MCDD+ melatonina y también con respecto a los otros dos grupos. Los niveles medios de IL y TNF- α fueron significativamente mayores en el grupo MCDD que en el grupo MCDD+ melatonina y mayores que en los otros dos grupos. Los grupos que tomaron dieta normal presentaron una histología hepática normal, libre de esteatosis. El grupo alimentado con MCDD sin tratamiento con melatonina desarrolló un hígado graso grado 3 con inflamación a expensas de

mononucleares. El grupo MCDD + melatonina mejoró el grado de inflamación, con grado 2 de esteatohepatitis. El grupo MCDD presentó un índice apoptótico significativamente mayor que el resto de grupos, por lo tanto la melatonina ha conseguido disminuir el índice apoptótico en ratas alimentadas con MCDD. Este estudio sugiere que la melatonina funciona como potente antioxidante, antiinflamatorio y antiapoptótico en NASH, debiendo ser considerada como una opción terapéutica.

En 2015 se publicó un interesante trabajo (Agil et al)²¹⁷ en el que se demostró la reducción de la disfunción hepática mitocondrial en ratas obesas. La disfunción mitocondrial juega un papel muy importante en la resistencia insulínica y en el desarrollo de esteatosis hepática. Se utilizó un modelo de roedor que utilizó ratas Zucker hembras, diabéticas y obesas y ratas sanas a las que se dio melatonina en una dosis de 10 mg/kg/día/vía oral en el agua de bebida durante 6 semanas. Se crearon dos grupos control a las que no se les administró melatonina, un grupo con ratas obesas diabéticas y otro grupo con ratas sanas. La función hepática se evaluó mediante la medición de ALT, AST, la histología hepática y la función mitocondrial hepática. Se observaron varias alteraciones funcionales de las mitocondrias hepáticas en el grupo control de ratas obesas en comparación con el grupo control de ratas sanas. El tratamiento con melatonina a ratas obesas disminuye los niveles séricos de ALT significativamente, disminuye la esteatosis hepática y la vacuolización y también disminuye las alteraciones mitocondriales inducidas por la diabetes, y el depósito de glucógeno y de lípidos. La melatonina mejora la disfunción mitocondrial mediante el aumento de la actividad de la citrato-sintasa mitocondrial y el complejo IV de la cadena de transferencia de electrones, mejora el estado 3 de la respiración, el índice de control respiratorio y el coeficiente de fosforilación; todo ello de manera significativa. La melatonina también aumenta la producción de ATP y disminuye los niveles de proteína desacoplante mitocondrial.

En 2007 se publicó (Subramanian et al)²¹⁸ otro estudio en modelo de roedor alimentado con dieta regular. Estudiaron el efecto de la administración de melatonina durante 45 días a dos dosis (0.5 y 1 mg/kg/día) vía intraperitoneal y se determinó la peroxidación lipídica y el perfil lipídico en cerebro e hígado. Ambas dosis de melatonina causaron un descenso significativo de la peroxidación lipídica y de los niveles de colesterol,

fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos en los tejidos examinados. Además aumentó la actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx). Este estudio refuerza la hipótesis de que la melatonina es efectiva en la reducción del estrés oxidativo y constituye un agente antihiperlipidémico.

Cabe mencionar otro artículo muy interesante publicado por el grupo de Atilgan et al.²¹⁹ en 2013 para evaluar la modificación de los parámetros de estrés oxidativo en ratas alimentadas con dieta alta en grasas, sometidas a discontinuación de la dieta o a melatonina. Aunque el objetivo de este estudio no era evaluar la mejoría de NAFLD, es decir, no se obtuvieron muestras de hígado para determinar los parámetros de estrés oxidativo, sino que se obtuvieron estos parámetros de una muestra de sangre y de testículo. Evaluaron los efectos antioxidantes producidos por la melatonina y la pérdida de peso en ratas con obesidad inducida, analizando dichos parámetros en suero y en testículos. Se realizaron 4 grupos con 7 ratas cada uno (n=28). Fueron los siguientes: grupo 1 o grupo control, grupo 2 con ratas a las que se les ha inducido una obesidad mediante dieta alta en grasas durante 8 semanas y posterior orquiectomía, grupo 3 con ratas a las que se ha inducido obesidad mediante dieta alta en grasas durante 8 semanas y se les ha administrado una sola dosis de melatonina (50 mg/kg/intraperitoneal) con posterior orquiectomía, grupo 4 con ratas a las que se ha inducido obesidad mediante dieta alta en grasas durante 8 semanas y luego durante 4 semanas más tomaron pienso estándar con posterior orquiectomía bilateral. Se analizaron los niveles de SOD, MDA y proteínas carbonilo (PC). Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes:

- Los niveles de MDA, PC y SOD aumentaron en tejido testicular y en sangre aumentaron en el grupo de obesidad en comparación con el grupo control (grupo 2 con respecto al grupo 1).
- La pérdida de peso (grupo 4) y el tratamiento con melatonina (grupo 3) mejoraron significativamente los niveles de MDA, PC y SOD en el tejido testicular y el suero.
- En el grupo 4 (ratas que discontinuaron la dieta esteatósica durante 4 semanas) disminuyeron su peso al discontinuar la dieta, aunque esta disminución no fue significativa.

También se han realizado estudios en humanos sobre la capacidad antioxidante de la melatonina en pacientes con hígado graso no alcohólico.

En 2010, Cichoz-Lanch et al.²²⁰ publicaron un estudio en humanos cuyo objetivo fue evaluar los efectos de la melatonina y el triptófano sobre una serie de parámetros bioquímicos en sangre en pacientes con NAFLD. Se seleccionaron 45 pacientes con diagnóstico histológico de NAFLD. Se dividieron en tres grupos. Grupo I: recibieron tratamiento con un preparado de fosfolípidos (Essentiale forte) tres veces al día y triptófano en una dosis de 500mg x2 al día vía oral durante 4 semanas. Grupo II: recibieron tratamiento con el preparado de fosfolípidos más melatonina en dosis de 5mg x2 al día vía oral durante 4 semanas. Grupo III: recibieron tratamiento con el preparado de fosfolípidos más placebo durante 4 semanas. Tras las 4 semanas de tratamiento, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la reducción de GGT, triglicéridos y citoquinas proinflamatorias en los grupos I y II.

En 2010 Gonciarz et al.²²¹ publicaron otro estudio en humanos. En este estudio, se incluyeron 42 pacientes con NAFLD confirmada histológicamente. Se realizaron dos grupos de estudio, un grupo de tratamiento, que incluyó 30 pacientes a los que se administró melatonina (2x5mg/día/vía oral durante 12 semanas) y otro grupo control a los que se administró placebo. Todos los pacientes se incluyeron en un programa de estilo de vida que consistía en realizar dieta equilibrada y ejercicio físico diario. No hubo diferencias significativas en cuanto a edad, IMC, niveles de ALT, AST, GGT, FA, COL, TG, glucosa y melatonina en los niveles basales al inicio del estudio. Se realizaron determinaciones cada 4 semanas. Durante este estudio, los niveles de ALT y de colesterol descendieron significativamente en ambos grupos, el grupo de tratamiento y el grupo placebo. Sin embargo, los niveles de AST Y GGT disminuyeron significativamente sólo en el grupo tratado con melatonina. Los niveles de FA no se modificaron a lo largo del estudio en ningún grupo. Los niveles plasmáticos de TG y glucosa, así como el IMC en ambos grupos, no se modificaron con respecto a su nivel basal. Los autores de este estudio concluyen que 3 meses de tratamiento con melatonina pueden reducir el nivel plasmático de enzimas hepáticas, sin embargo, se necesitarían estudios con un período de tratamiento con melatonina más largo y con un mayor tiempo de seguimiento para sacar resultados significativos. Este estudio demuestra por

primera vez en humanos que tres meses de tratamiento con melatonina mejora significativamente las enzimas hepáticas plasmáticas en pacientes con NAFLD.

En 2012, los autores del anterior estudio publicaron otro trabajo²²² donde se representa el seguimiento de las primeras observaciones. El objetivo era demostrar el efecto beneficioso mantenido de la melatonina administrada durante un período de 12 semanas más, después de las 12 semanas de melatonina que habían recibido en el estudio anterior y a su vez demostrar si la respuesta al tratamiento con melatonina se mantendría después de haber interrumpido el tratamiento con la misma. Se incluyeron un total de 42 pacientes con diagnóstico de NAFLD que habían participado en el estudio anterior. A 30 de ellos se les trató con melatonina (5mg x 2 veces día vía oral) y a 12 se les administró placebo. Además todos los pacientes realizaron ejercicio diario y mantuvieron una dieta equilibrada. Se sometieron a determinaciones bioquímicas cada 6 semanas durante el período de tratamiento (12 semanas) y después a las 12 semanas de haber concluido el tratamiento. Los niveles de ALT respecto al nivel basal, se redujeron significativamente en la semana 18, 24 y en el seguimiento posterior sin tratamiento en ambos grupos. AST Y GGT disminuyeron sólo en el grupo tratado con melatonina de manera significativa durante el tratamiento con melatonina y en el seguimiento posterior. En ambos grupos, los niveles de COL, TG, glucosa, FA persistieron con niveles normales, sin descenso significativo. En este estudio no se modificaron los resultados obtenidos en 2010, a pesar de haber alargado el tratamiento con melatonina. Sin embargo, sí que se demostró una persistencia del descenso de enzimas hepáticas a pesar de haber suspendido el tratamiento con melatonina.

En 2014, Celinski et al.²²³ se publicaron un nuevo estudio con mayor número de pacientes. El objetivo del estudio fue determinar los efectos de la melatonina y el triptófano en una serie de parámetros bioquímicos e histológicos en pacientes con hígado graso no alcohólico. Se seleccionaron 74 pacientes con hígado graso confirmado mediante exámen histopatológico. Los pacientes fueron asignados aleatoriamente a tres grupos de estudio. Grupo I: se les administró un preparado de fosfolípidos (Essentiale forte) y triptófano en dosis de 2x500 mg/día/vía oral durante 14 meses. Grupo II: se les administró el preparado de fosfolípidos y melatonina en dosis de 2x5 mg/kg/vía oral durante 14 meses. Grupo III: se les administró sólo el preparado de fosfolípidos durante

14 meses. Tras los 14 meses de tratamiento, 9 pacientes en total de los 3 grupos (3 del grupo I, 4 del grupo II y 2 del grupo III), se sometieron a biopsia hepática. Los niveles de GGT, TG Y LDL se redujeron significativamente en el grupo I y II. También se observó un descenso significativo de IL-1, IL-6 y TNF- α en los pacientes que recibieron melatonina y triptófano en comparación con los pacientes del grupo III. Los autores del estudio concluyen que la melatonina y el triptófano son capaces de reducir sustancialmente los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y de parámetros bioquímicos lipídicos en pacientes con hígado graso no alcohólico. Por lo tanto, la melatonina debería ser considerada como fármaco en la terapia del hígado graso no alcohólico.

En 2013, Gonciarz et al.²²⁴ publicaron un trabajo sobre el efecto de la melatonina sobre la resistencia a la insulina, la leptina, la adiponectina, la resistina, la ghrelina y las enzimas hepáticas en pacientes con EHNA. En este estudio se seleccionaron 16 pacientes con estudio histológico de EHNA y sobrepeso, a los que se les administró una dosis de melatonina de 10 mg/día durante 28 días. Se seleccionaron 15 pacientes control, que fueron pacientes sanos. La mediana de los valores basales de resistencia insulínica, leptina y resistina fue mayor en los pacientes con EHNA con respecto a los controles. La mediana del nivel basal de adiponectina fue menor en los pacientes con EHNA con respecto a los controles. No hubo diferencias en cuanto al nivel basal de ghrelina. Tras el tratamiento con melatonina, la mediana de los valores de resistencia insulínica fue reducida significativamente un 60% respecto a los valores basales. Sin embargo, los niveles de adiponectina, de leptina y de grelina en plasma aumentaron significativamente un 119%, un 33% y un 20% respectivamente. No hubo diferencias en cuanto a la resistina. También se observó una disminución significativa de enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT) al final del tratamiento con melatonina con respecto a los niveles basales. La adiponectina, la leptina y la ghrelina son sustancias con propiedades antiinflamatorias, estabilizadoras de la homeostasis y del metabolismo y con propiedades antioxidantes. En este estudio se demuestra los efectos homeostáticos y antioxidantes de la melatonina de manera indirecta, aumentando la concentración de hormonas y citoquinas antiinflamatorias. Se confirma también lo observado en estudios anteriores en cuanto a la acción de la melatonina en la disminución de enzimas hepáticas, que traduce una disminución del daño o lesión hepática.

No existen apenas modelos en grandes animales del efecto de la melatonina sobre la esteatosis inducida por dieta y casi todos ellos se basan en la producción de esteatosis por medio de tóxicos (con daño directo celular hepático), así pues un modelo de esteatosis en grandes animales inducido por dietas especiales sería el modelo ideal donde probar el efecto de la melatonina como antioxidante en la reversión de la esteatosis hepática.

4. ESTUDIOS PREVIOS

Se realizó un estudio experimental previo con 6 cerdos Large White-Landrace. Estos animales fueron alimentados durante dos meses con una dieta especial con alto contenido en grasa saturada, rica en colesterol y deficiente en metionina y colina, con el objetivo de inducir una esteatosis hepática.

Pasados dos meses, se comprobó mediante ecografía abdominal externa y biopsia transcutánea ecodirigida (Fig.35), el grado de esteatosis inducido en estos animales. En la ecografía se pudo observar un aumento del tamaño hepático y una hiperrefringencia en cada uno de ellos.



Fig.35. Ecografía hepática y biopsia mediante tru-cut transcutánea.

Las muestras fueron examinadas mediante visión directa del patólogo, determinándose las siguientes variables:

- Grado de esteatosis.
- Distribución de la esteatosis.
- Morfología de la esteatosis.
- Grado de fibrosis.

El resultado de las muestras obtenidas demostró una transformación grasa de los hepatocitos en un porcentaje mayor al 50% de esteatosis en todas las muestras, de localización centrolobulillar.

Transcurridas 4 semanas tras la biopsia ecodirigida (alrededor de 3 meses desde el inicio del estudio), se les practicó una biopsia a cielo abierto bajo anestesia general para obtener muestras significativas del hígado. Las muestras se fijaron en formaldehído tamponado al 10% durante un periodo de 24 h. para su procesado en parafina, secciones de 3 micras, tinción de HE. Se estudió para cada muestra el grado de esteatosis mediante visión directa del patólogo, además de la distribución de la esteatosis y el grado de fibrosis.

En este estudio previo no se obtuvieron muestras de sangre para estudio bioquímico de función hepática ni se obtuvieron muestras de hígado congelado para estudio de parámetros de estrés oxidativo. El porcentaje de esteatosis encontrado fue alto en todos los animales, con porcentajes que varían entre 80 y 90%.

Los animales continuaron recibiendo dieta esteatósica durante todo el experimento y además se les administró una dosis diaria de melatonina de 10 mg/kg/día via oral durante 4 semanas para valorar su efecto sobre la evolución de la esteatosis.

Tras el periodo de administración de melatonina los animales fueron sacrificados obteniéndose biopsia hepáticas para compararlas con las anteriores, la hipótesis planteada fue que la melatonina era capaz de reducir la esteatosis hepáticas tras 4 semanas de administración, administrando simultáneamente dieta especial alta en grasas.

Caso 1

- Grado de esteatosis basal tras 3 meses de dieta esteatósica: 80% (Fig.36).
- Grado de esteatosis tras 3 meses de dieta esteatósica + 4 semanas de dieta esteatósica y melatonina: 80% (Fig.37).

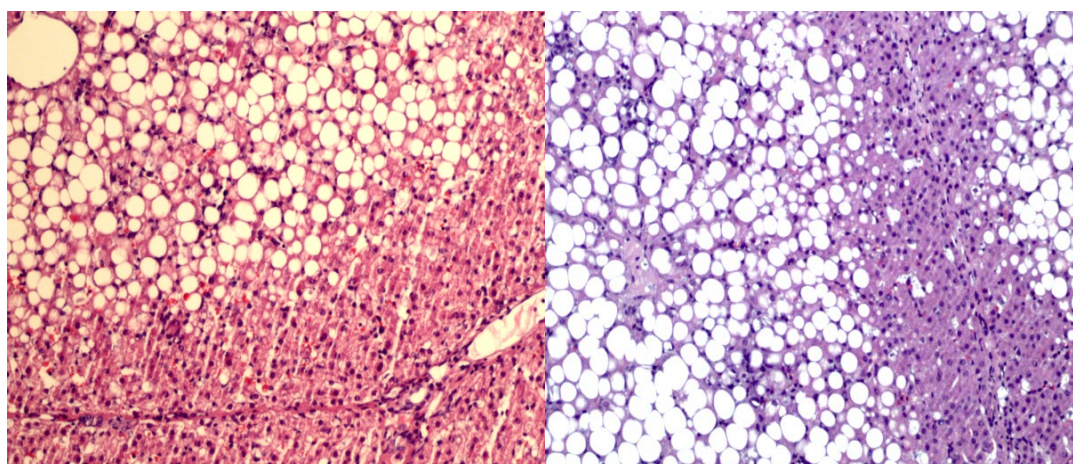


Fig.36. HE 20X (80% esteatosis). **Fig.37.** Tras 4 sem. de melatonina HE 20x (80% esteatosis).

Caso 2

- Grado de esteatosis basal tras 3 meses de dieta esteatósica: 80% (Fig.38).
- Grado de esteatosis tras 3 meses de dieta esteatósica + 4 semanas de dieta esteatósica y melatonina: 80%. Cierta grado de fibrosis septal (Fig.39).

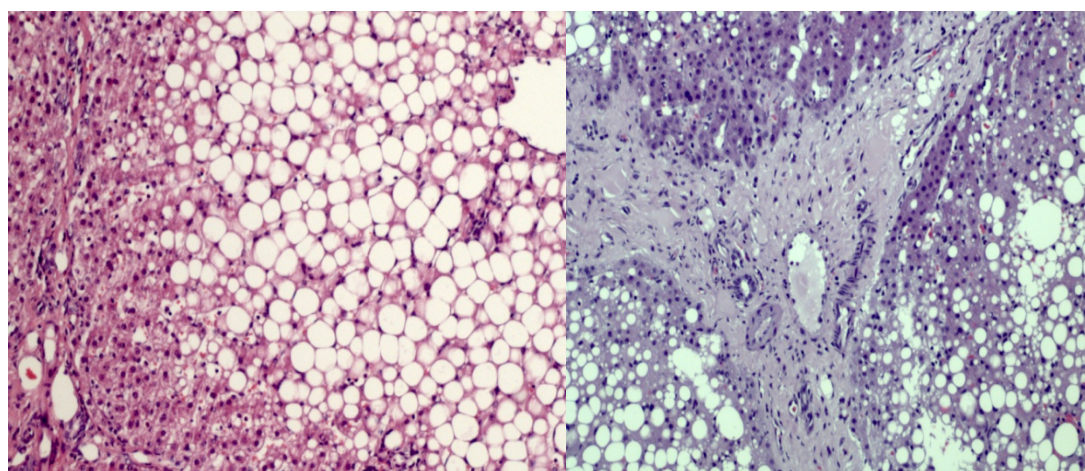


Fig.38. HE 20X (80% esteatosis). **Fig.39.** Tras 4 sem. de melatonina HE 20x (80% esteatosis).

Caso 3

- Grado de esteatosis basal tras 3 meses de dieta esteatósica: 90% (Fig.40).
- Grado de esteatosis tras 3 meses de dieta esteatósica + 4 semanas de dieta esteatósica y melatonina: 70%. Discreta fibrosis portal (Fig.41).

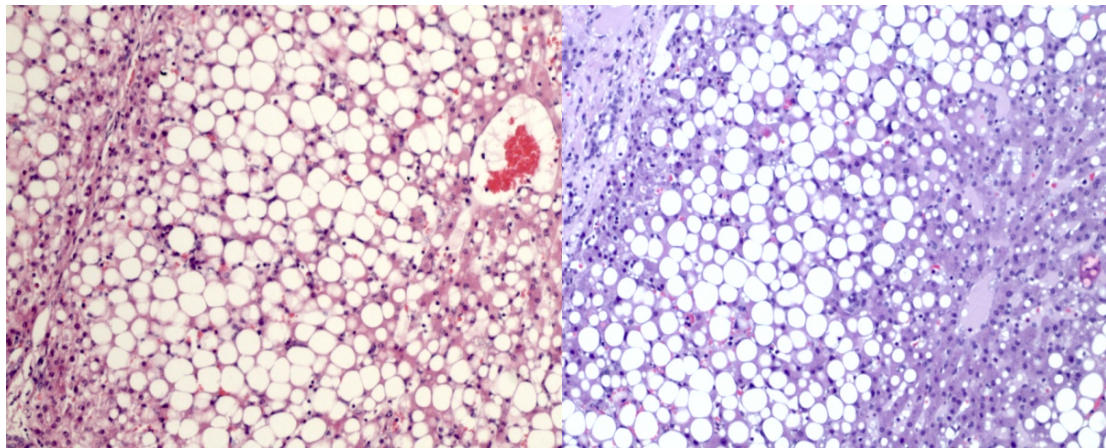


Fig.40. HE 20X (90% esteatosis). **Fig.41.** Tras 4 sem. de melatonina HE 20x (70% esteatosis.).

Caso 4

- Grado de esteatosis basal tras 3 meses de dieta esteatósica: 90% (Fig.42).
- Grado de esteatosis tras 3 meses de dieta esteatósica + 4 semanas de dieta esteatósica y melatonina: 80%. (Fig.43).

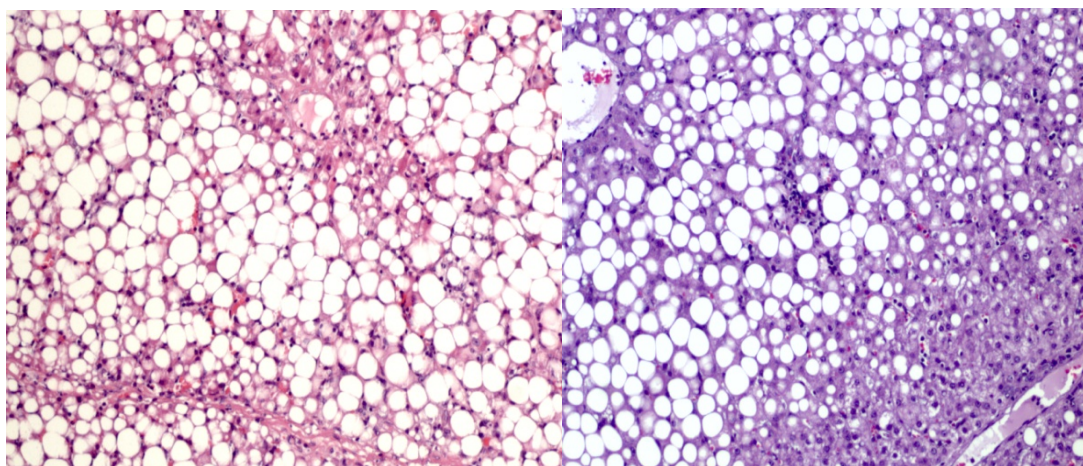


Fig.42. HE 20X (90% esteatosis). **Fig.43.** Tras 4 sem. de melatonina HE 20x (80% esteatosis).

Caso 5

- Grado de esteatosis tras 3 meses de dieta esteatósica: 90% (Fig. 44).
- Grado de esteatosis tras 3 meses de dieta esteatósica + 4 semanas de dieta esteatósica y melatonina: 80%. También se observó regeneración de los hepatocitos centrolobulillares (Fig. 45). No fibrosis septal.

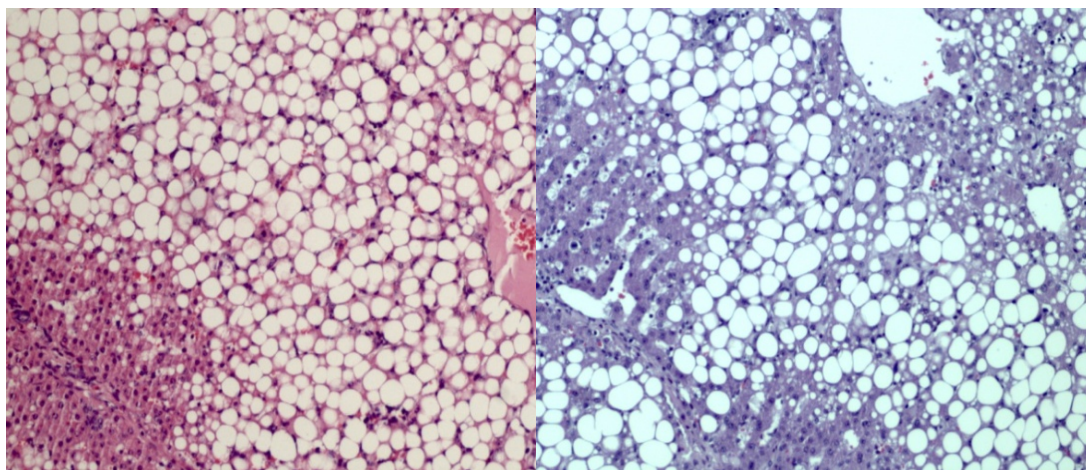


Fig.44. HE 20X (90% esteatosis). **Fig.45.** Tras 4 sem. de melatonina HE 20x (80% esteatosis).

Cerdo 6

- Grado de esteatosis basal tras 3 meses de dieta esteatósica: 90%. Se observan lagos de grasa por ruptura de las membranas citoplasmáticas de hepatocitos (Fig.46).
- Grado de esteatosis tras 3 meses de dieta esteatósica + 4 semanas de dieta esteatósica y melatonina: 90%. Se siguen observando lagos de grasa (Fig.47).

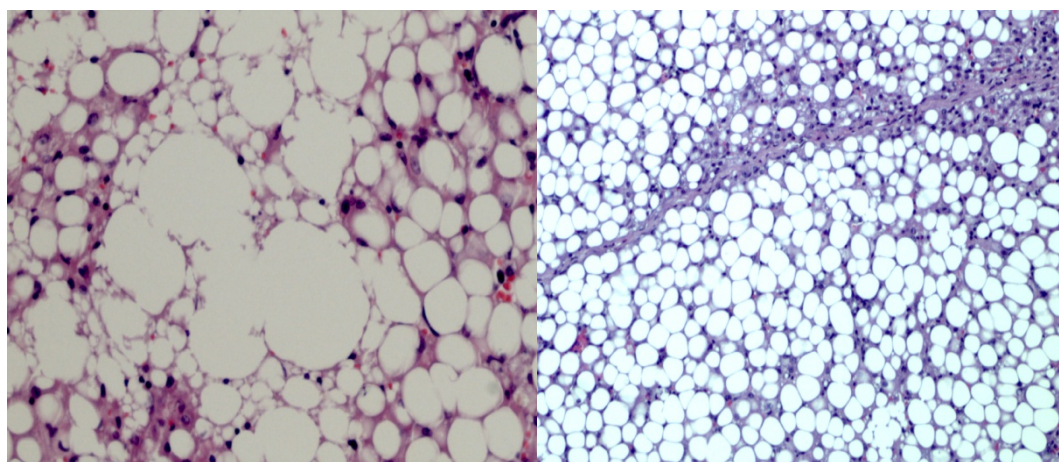


Fig.46. HE 20X (90% esteatosis). **Fig.47.** Tras 4 sem. de melatonina HE 20x (90% esteatosis).

En resumen, se observó una mejoría de la esteatosis en un 10-20% con regeneración de los hepatocitos centrolobulillares en 3 de las 6 muestras. En las otras 3 muestras el grado de esteatosis se mantiene pero no aumenta a pesar de mantener la dieta esteatósica en combinación con melatonina. En una de estas muestras en la que no se observó mejoría se observa fibrosis septal, por lo que debería considerarse que se trata de una progresión de la enfermedad aunque no empeorara el grado de esteatosis.

5. HIPÓTESIS

5.1. HIPÓTESIS PRINCIPAL

- La melatonina es un tratamiento efectivo para revertir la esteatosis hepática establecida e inducida mediante una dieta especial en un modelo animal porcino.

5.2. HIPÓTESIS SECUNDARIAS

- El modelo de esteatosis basado en alteraciones en la dieta evitando la toxicidad celular directa, desarrollado por nuestro equipo de investigación, es un modelo efectivo y reproducible para inducir un alto grado de esteatosis hepática en pocas semanas.
- La melatonina es un tratamiento eficaz para mejorar los parámetros serológicos de función hepática en la esteatosis inducida mediante dieta especial en un modelo animal porcino.
- La melatonina es un tratamiento eficaz para mejorar los parámetros de estrés oxidativo producidos en la esteatosis hepática inducida mediante dieta especial en un modelo animal porcino.
- Modificaciones en la dieta habitual encaminadas a reducir la ingesta de grasas produce una mejoría en el grado de esteatosis hepática a nivel histológico, así como mejoría de los datos serológicos de función hepática y de los parámetros de estrés oxidativo.
- El análisis digital de imágenes diseñado por nuestro grupo de investigación como método de determinación del grado de esteatosis hepática es un método válido, sencillo y libre de subjetividad.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio experimental prospectivo realizado en animal de experimentación, utilizando un modelo animal porcino.

El período de experimentación comenzó en Mayo de 2012 y concluyó en Mayo de 2014, por lo que tuvo una duración de dos años.

Ha sido llevado a cabo por el equipo de investigación liderado por el Dr. Güemes, investigador del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (Grupo GIIS002).

La fase experimental se desarrolló en el Servicio de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

6.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

6.2.1. MODELO Y MUESTRA: ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Utilizamos cerdo Large White-Landrace o gran cerdo blanco inglés como animal de experimentación (Fig.48). Se ha elegido este modelo por ser un modelo más acorde con la fisiología hepática del humano y por poseer una gran experiencia en estudios anteriores de nuestro grupo.



Fig.48. Imagen que muestra a uno de los cerdos del estudio, de raza Lague White.

Los cerdos se obtuvieron de una granja de cría para experimentación animal, libres de enfermedades y parásitos con un peso aproximado de 45 kg y una edad aproximada de 6 meses.

Todos los animales del estudio se recibieron en tres tandas. La primera tanda de animales se recibió en Mayo de 2012, la segunda tanda en Enero de 2013 y la última tanda en Febrero de 2014.

Los animales fueron recibidos en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria (Servicio de Experimentación Animal, SAI), donde fueron estabulados en cubículos. En la granja los animales convivieron en jaulas compartidas por 3 o 4 animales, y que estaban dotadas de comederos con pienso y acceso al agua ad libitum. Estaban vigilados a diario por auxiliares de la Facultad de Veterinaria del Servicio de Experimentación Animal, quienes se encargan de su nutrición, de su cuidado diario y de la administración del fármaco a estudio.

6.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Cerdo de raza Lague White-Landrace, procedente de una granja de cría para experimentación animal, de tamaño mediano, jóvenes (aproximadamente 6 meses de vida), sanos.

6.2.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del experimento todos los animales que no cumplieran un peso mínimo (30 Kg) o que presentaban signos de enfermedad (diarrea, adinamia, dermatosis, conducta anormal).

6.2.4. JUSTIFICACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

En base al objetivo “*Estudiar el efecto de la melatonina sobre la reversión de la esteatosis inducida en un modelo animal porcino*” y, considerando como variable principal “*cambio en la esteatosis hepática*”, se determinan como resultados principales del estudio los valores medios de la esteatosis hepática determinada por patólogo, tanto en la primera biopsia o biopsia pre como en la segunda biopsia o biopsia post.

Por lo anterior, para valorar la diferencia entre el valor medio de la esteatosis hepática entre la primera y la segunda biopsia, se plantea un *contraste de hipótesis de comparación de medias para grupos relacionados*. Se aspira a poder declarar una diferencia de 35 puntos o superior como estadísticamente significativa, con un nivel de confianza del 95% y una potencia del 80%, para lo que se establece en 20 pacientes el tamaño muestral óptimo para el presente estudio, 5 animales en cada uno de los cuatro grupos planteados. Un tamaño superior permitirá aumentar la potencia y poder declarar una diferencia de medias inferior como estadísticamente significativa.

La estimación se ha basado en los resultados de un estudio piloto realizado previamente por el grupo. Se ha calculado el tamaño muestral con el programa Epidat 4.1, mediante la opción de contraste de hipótesis, comparación de medias para grupos relacionados.

6.3. DESARROLLO DEL ESTUDIO

6.3.1. GRUPOS DE ESTUDIO

Todos los animales fueron sometidos, tras su llegada a las instalaciones y un periodo de adaptación y observación de 72 h., a una dieta para producir esteatosis hepática, especialmente desarrollada por nuestro grupo. Dicha dieta fue mantenida durante 3 meses, al cabo de los cuales fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico con anestesia general para obtener una muestra suficiente de hígado para estudio, así como muestras de sangre y suero.

Tras la intervención, los cerdos esteatósicos fueron asignados a 4 grupos de estudio, manteniendo o no la dieta esteatósica y tratándose o no con melatonina durante otro período de un mes. Tras este período de tiempo los animales se vuelven a someter a otro procedimiento quirúrgico con anestesia general para obtener muestras de hígado y de sangre. Al finalizar la intervención, los animales se sacrifican.

Dado que solo se iba a estudiar la capacidad de la melatonina de reducir el grado de esteatosis y no de prevenirla, es decir valorar la reversibilidad de la esteatosis mediante el tratamiento con melatonina, utilizamos 4 grupos de estudio para individualizar el efecto del fármaco de manera independiente al efecto de la dieta. Se estudió también un grupo control con 6 cerdos que no recibieron dieta esteatósica ni fármaco alguno.

Los grupos fueron los siguientes:

- Grupo estudio 0: grupo control: animales sanos sin esteatosis, sometidos a dieta normal no esteatósica. Se les practicó una intervención quirúrgica para la toma de muestra, tras la cual los animales fueron sacrificados.
- Grupo estudio 1: animales a los que se indujo una esteatosis hepática mediante dieta durante 3 meses, mantuvieron dieta esteatósica durante 1 mes más y recibieron tratamiento con melatonina en el último mes.

- Grupo estudio 2: animales a los que se indujo una esteatosis hepática mediante dieta durante 3 meses, mantuvieron dieta esteatósica durante 1 mes más y no recibieron fármaco alguno.
- Grupo estudio 3: animales a los que se indujo una esteatosis hepática mediante dieta durante 3 meses, discontinuaron la dieta esteatósica durante 1 mes y recibieron tratamiento con melatonina en el último mes.
- Grupo estudio 4: animales a los que se indujo una esteatosis hepática mediante dieta durante 3 meses, posteriormente discontinuaron la dieta durante un mes más y no recibieron fármaco alguno.

En el siguiente esquema (Fig.49) se puede observar de manera gráfica la dieta y el tratamiento que siguieron los diferentes grupos de estudio.

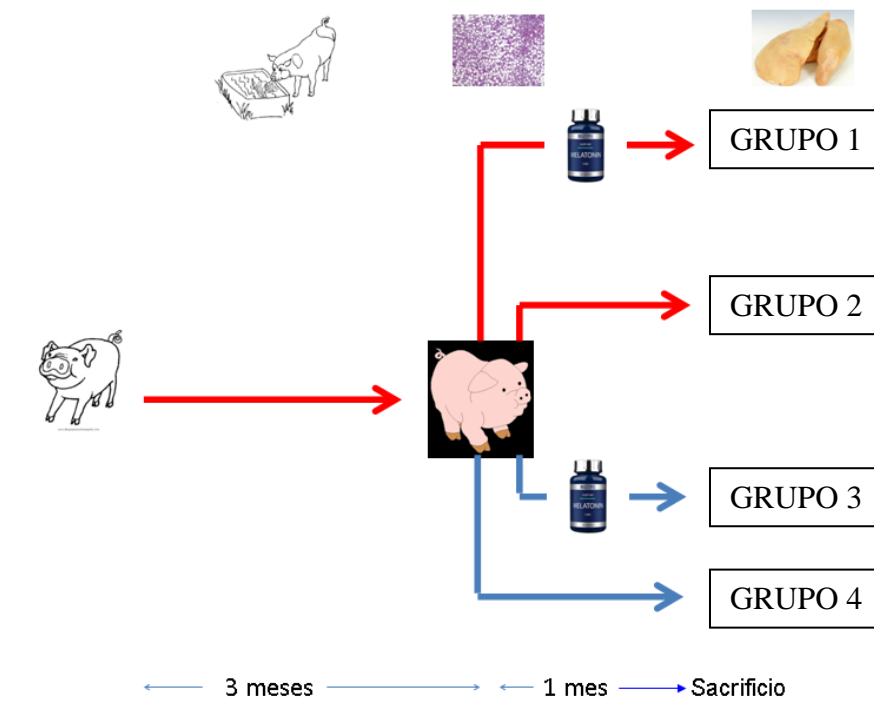


Fig.49. Esquema de la distribución de los grupos, en rojo dieta esteatósica, en azul dieta basal.

6.3.2. INDUCCIÓN DE LA ESTEATOSIS HEPÁTICA

En el cerdo de experimentación se puede inducir una esteatosis hepática por medio de una dieta especialmente desarrollada y probada que asemeja a la inducción de esteatosis en el humano, sin necesidad de utilizar fármacos ni productos tóxicos.

La inducción de la esteatosis se realizó por medio de una dieta especial cuyas características principales fueron:

- Alto contenido en grasa saturada (25 %).
- Deficiente en metionina (<1/4 de las necesidades) y colina (1/6 de las necesidades).
- Suplementada con 2 % de colesterol y 0,5 % de colato sódico. En la siguiente tabla se presenta la composición de la misma.

En la siguiente tabla (Tabla 1) se presenta la composición de la misma:

Ingredientes	%	Principios inmediatos	(%)
Almidón	12,0	E. Metabolizable (kcal/kg)	4.014
Fructosa	18,0	Proteína bruta	8,5
Maltodextrina	14,4	Extracto etéreo	25,2
Sacarosa	2,0	Fibra bruta	8,0
Celulosa	10,0	FND	10,1
Paja	1,5	Almidón	11,5
Grasa hidrogenada	25,0	Lisina	0,85
Harina plumas	5,6	Metionina	0,07
Plasma porcino	4,0	Colina (mg/kg)	50,3
Colesterol	2,0		
Colato sódico	0,5		
Cloruro sódico	0,4		
A. ácidos y minerales	4,5		
Corrector Vit. Min.	0,2		

Tabla 1. Ingredientes y composición de la dieta esteatósica.

Este método de producción de esteatosis no utiliza ningún agente tóxico ni farmacológico, por lo que puede semejarse mucho más a las condiciones fisiológicas y bioquímicas de la esteatosis hepática humana.

Las dietas de los animales del grupo control fueron dietas convencionales a base de pienso “control” formulado con alto contenido en fibra y con una menor concentración energética de 2.600 kcal EM/kg, menor a la recomendada (80 % de las necesidades), pero manteniendo la relación energía/lisina, con el fin de ralentizar el crecimiento y evitar el engrasamiento. Ambas dietas, la control y la esteatósica fueron ofrecidas ad libitum (en esto se diferencia del resto de los preparados formulados para inducir una esteatosis, los cuales se suelen basar en la administración forzada de ingentes cantidades de grasa que el organismo no es capaz de metabolizar). La formulación de los componentes en ambas dietas se realizó mediante la aplicación informática Brillant Expert.

6.3.3. ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA

Los animales pertenecientes a los grupos estudio 1 y 3 recibieron dosis de melatonina de 10 mg/Kg/día vía oral durante 4 semanas. Esta dosis se consideró una dosis elevada, según trabajos de bibliografía consultados (la dosis humana habitual es de 2 mg/24 h.), aunque no tóxica.

La melatonina se obtuvo de un proveedor comercial en forma de polvo siendo homologada para su administración a animales de experimentación y para consumo humano. El fármaco se adquirió en forma de polvo, el cual fue encapsulado en un excipiente de sacarosa en dosis de 200, 100 y 50 mg. Las cápsulas se prepararon en el servicio de farmacia del Hospital Clínico Universitario. Se administró en una única toma por medio de las citadas cápsulas que fueron ingeridas a la vez que la alimentación descrita anteriormente. La administración fue vía oral mediante una dosis única diaria del fármaco mezclado con parte de la dieta (para asegurar su ingesta completa). El personal de cuidados del Servicio de Experimentación Animal se aseguró de que los animales ingirieron la dosis de melatonina junto con la ingesta normal.

6.3.4. DIAGNÓSTICO DE ESTEATOSIS

Los animales fueron sometidos a la dieta experimental durante tres meses, pasados los cuales se espera una esteatosis significativa. El diagnóstico de esteatosis se realizó mediante biopsia hepática de la parte distal del lóbulo medial izquierdo, a través de una minilaparotomía media realizada bajo anestesia general. De esta manera se aseguró una cantidad suficiente de tejido hepático para establecer el diagnóstico de esteatosis.

6.3.5. QUIRÓFANO. INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA Y ANESTESIA

Durante todo el proceso, el animal fue sometido a dos intervenciones quirúrgicas para obtener biopsias hepáticas y muestras de sangre. La primera intervención se realizó pasados tres meses tras el inicio de la dieta esteatósica. Esta primera intervención quirúrgica nos permitió cuantificar la presencia de esteatosis hepática. Tras esta primera intervención quirúrgica, los animales fueron asignados a los cuatro grupos de estudio anteriormente expuestos, y permanecieron durante un mes más con o sin dieta esteatósica, con o sin melatonina hasta que se realizó la segunda toma de muestras. En la segunda operación se realizaron los mismos pasos que en la primera, obteniendo las mismas muestras. Tras la segunda intervención, el animal fue sacrificado.

Todas las operaciones se realizaron en el Servicio de Experimentación Animal, ubicado en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Dichas intervenciones se realizaron en un quirófano experimental equipado, que está dotado de dos puestos para realizar simultáneamente dos intervenciones quirúrgicas bajo anestesia. Se utiliza equipo quirúrgico en condiciones de esterilidad y equipo de anestesia general para animales medianos.

Tras una sedación con Zolatil y Metomidina im, se les cateterizó una vía periférica en la oreja. Tras preoxigenar al animal se administrará Propofol para proceder a la intubación en decúbito prono (Fig.50). Se monitorizaron las constantes hemodinámicas y el EKG durante todo el procedimiento.



Fig.50. Cateterización de vía periférica en la oreja e intubación del animal en decúbito prono.

En el tiempo anestésico diferenciamos dos fases, premedicación y mantenimiento; en las que se emplearon los siguientes fármacos:

- Premedicación e inducción: Zoletil 100 (Tiletamina + Zolacepam) 5mg/kg IM + Medetomidina (sedador) 0.01mg/kg IM. El zoletil 100 lleva 50mg/ml de Tiletamina y 50mg/ml de Zolacepam, es decir, se administran 2,5mg/kg de cada uno. Con esta sedación se cateteriza una vía periférica en la oreja y se procede a la intubación del animal en decúbito prono. Si con esta medicación no es suficiente mientras se cateteriza la vía y se intuba, en ocasiones se administra una dosis adicional con la mitad de la dosis inicial. Si siguen con reflejo de deglución al intubar, se añaden 2-3 ml de propofol IV. Una vez intubados se pasa a la fase de mantenimiento.

- Mantenimiento: Isoflurano (rotámetro 1,5 - 2) vaporizado en mezcla de O₂ + aire. En esta fase se utiliza anestesia inhalatoria. Si durante la cirugía el animal muestra dolor o mal plano anestésico, se añadió 2-3 ml de propofol IV.

Se colocó el animal en posición de decúbito supino (Fig.51) y se realizó laparotomía media, de aproximadamente 10 cms de longitud (Fig.52). Por lo tanto, las muestras se obtuvieron in vivo a través de una laparotomía media (biopsia a cielo abierto).

Tras la realización de la laparotomía, se inspeccionó la cavidad abdominal y se observaron las características macroscópicas del hígado (Fig.53). A continuación se aislaron los lóbulos hepáticos más accesibles para realizar la biopsia, que son los segmentos III, IV y V (Fig.54). Se escogió para la toma de muestras el segmento IV o lóbulo medial izquierdo (Fig.55).

Tras la biopsia se realizó sutura hemostática del lecho de resección hepática y coagulación con bisturí eléctrico. El cierre de la laparotomía se realizó mediante sutura continua de monofilamento irreabsorbible para el plano muscular y sutura continua de seda para la piel (Fig.56). Se utilizó para proteger la herida un apósito cicatrizante basado en un spray de sulfadiazina de plata (Fig.57).



Fig.51. Animal anestesiado y colocado en decúbito supino para realizar la laparotomía.



Fig.52. Laparotomía del cerdo, de aproximadamente 10 cms.



Fig.53. Imagen de laparotomía en el cerdo donde se observa el contraste de color entre el hígado esteatósico (en la parte superior de la imagen) de color rojizo-amarillento y el bazo (en la parte inferior de la imagen).

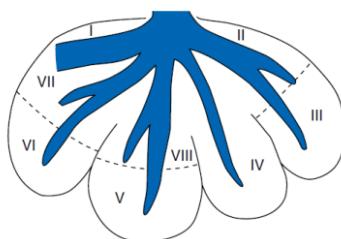


Fig54. Esquema de la anatomía hepática porcina.



Fig.55. Laparotomía del cerdo y toma de una muestra en cuña de tejido hepático.



Fig.56. Cierre de la laparotomía mediante sutura continua.



Fig.57. Aspecto final de la herida quirúrgica tras la aplicación de un spray de plata.

6.3.6. TOMA DE MUESTRAS

Se tomaron las siguientes muestras:

- Muestra histológica del hígado: se obtuvieron 2 biopsias de hígado del segmento IV. Se anotó su aspecto general y sus características macroscópicas.
 - De las dos muestras obtenidas:
 - Una de ellas se guardó en formaldehído para su estudio anatómo-patológico. Se utiliza formaldehído al 10% durante un periodo de 24 h. para su procesamiento en parafina, secciones de 3 micras, tinción de HE. Posteriormente es tallada y observada al microscopio. Las dos muestras se fijaron inmediatamente tras su laminación en formaldehído tamponado.
 - Otra muestra fue congelada y conservada en nitrógeno líquido para la obtención de los parámetros de estrés oxidativo: malondialdehído (MDA) y carbonilos.
- Análisis sanguíneo: se obtuvo una muestra de 20 ml de sangre venosa extraída de la vena porta o de la vena cava. La sangre fue centrifugada a 3000 revoluciones durante 3 minutos para obtener suero. De la muestra sanguínea se obtienen los parámetros bioquímicos.

Para la recogida de muestras, se utilizaron diferentes contenedores específicos: vacutainers, tubos de criopreservación, botes con formol, etc. (Fig.58):



Fig.58. Recipientes utilizados para la toma de muestras.

6.3.7. REANIMACIÓN

Después de la extracción de muestras tras la primera intervención quirúrgica, los animales fueron despertados de la anestesia y trasladados a jaulas situadas en las inmediaciones del quirófano, en grupos de tres animales (Fig.59). Permanecieron en este habitáculo varias horas hasta que el animal recuperó la movilidad completa y pudieron ser trasladados a la granja de origen. Durante este período de adaptación desde el quirófano a la granja nos cercioramos de que el animal no ha sufrido ninguna complicación precoz derivada de la cirugía o de la anestesia.



Fig.59. Animales en jaulas recuperándose de la anestesia.

6.3.8. SACRIFICIO

Tras la segunda intervención quirúrgica los animales fueron sacrificados. Con el animal bajo anestesia general se administra cloruro potásico IV + 5-7 ml/animal del eutanásico T-61. El T-61 que utilizamos contiene por ml 0.2g de embutramida, 0.05g de Mebezonio yoduro y 0,005 g de Tetracaína clorhidrato. Tras la eutanasia, los cuerpos fueron tratados como residuos orgánicos y depositados en vertederos especiales presentes en las inmediaciones de los quirófanos y destinados a ese fin.

6.3.9. PROCEDIMIENTO PARA LA MEDICIÓN DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MUESTRA HISTOLÓGICA

El estudio bioquímico de estrés oxidativo en la muestra histológica congelada se realizó en los laboratorios de Fisiología del Envejecimiento y del Estrés Oxidativo, ubicados en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza.

6.3.10.1. Equipamiento de laboratorio

- Agitadores: Vórtex Velp Scientifica® zx3 y vórtex Heidolph® REAX 2000 (Fig.60).
- Balanza de precisión Cobos® CBH-300J.
- Balanza de precisión Cobos® A-220 CB.
- Baño termostatzado con agitación Bunsen® BTG-1 (Fig.61).
- Centrifuga Beckman® Avanti 30™, refrigerada y equipada con dos rotores: F1010 para 10 tubos de 10 mL H6002 para tubos Eppendorf de 1,5 y 2 mL (Fig.62).
- Espectofotómetro Beckman-Coulter® DU800 con cubetas de plástico desechables para medir el rango visible y cubetas de cuarzo para medir en el rango ultravioleta (UV) (Fig.63).
- Homogeneizador de teflón acoplado a un rotor Heidolph® RZR 2020.
- Homogeneizador Ultra-Turrax Janke&Kunkel® T25 (Fig.64).
- Dos juegos de pipetas de precisión Gilson®: P-20, P-200, P-1000 y P-5000.
- Un juego de pipetas Eppendorf®: 0,1-2,5; 2-20; 10-100; 50-250 y 200-1000.
- pHmetro Crison® micro pH 2001 equipado con sonda de temperatura.
- Sistema de agua destilada Milipore® MilliRX.
- Sistema de agua ultrapura de Millipore® MilliQ.
- Nevera (-20°C) LIEBHERR Premium.
- Ultracongelador (-80°C) Ing. CLIMAS CVF 350/80.



Fig.60. Agitador vórtex Heidolph® REAX 2000.



Fig.61. Baño termostatzado con agitación Bunsen® BTG-1.



Fig.62. Centrifuga Beckman® Avanti 30™.

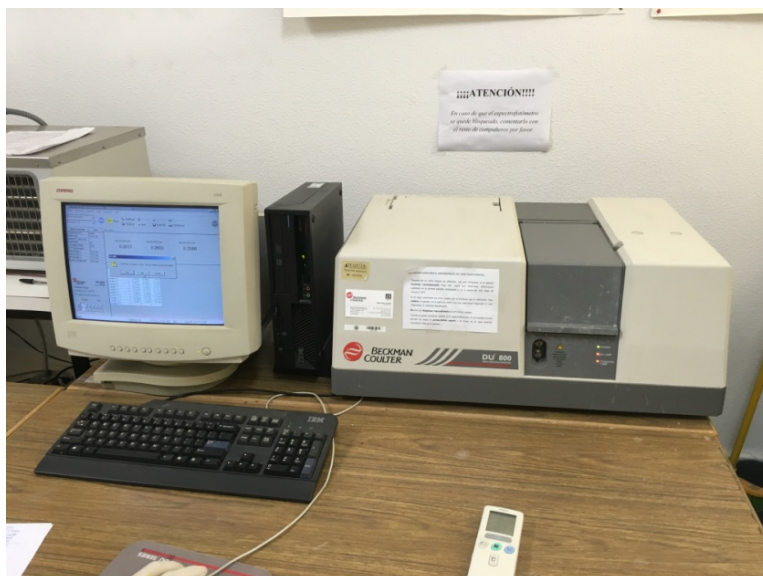


Fig.63. Espectrofotómetro Beckman-Coulter® DU800.



Fig.64. Homogeneizador Ultra-Turrax Janke&Kunkel® T25.

6.3.10.2. Homogeneización del tejido hepático

Una vez pesado el hígado se troceó con bisturí sobre una placa Petri situada en hielo y los pedazos se introdujeron en un Homogeneizador Ultra-Turrax Janke & Kunkel® T25. Se añadió tampón Tris-HCl 20 mM a razón de 1:10 p/v. La velocidad del homogeneizador fue de 300 revoluciones por minuto. Todo este proceso se realizó en frío para reducir al máximo posible la degradación enzimática tisular manteniendo el vidrio de homogeneización en hielo picado. Posteriormente las muestras se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser utilizadas en los ensayos.

6.3.10.3. Cuantificación de la peroxidación lipídica (Malondialdehído+4-HDA)

La acción de los radicales libres sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las muestras celulares, provocando su peroxidación. Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica (LPO) son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, siendo mayoritarios el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos (4-HDA). Por lo tanto la concentración de MDA+4-HDA es un indicador del grado de peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas. La concentración de MDA+4-HDA se determinó por un método colorimétrico basado en la reacción de un reactivo cromógeno, el N-metil-2-fenilindol, con el MDA o con los 4-HDA, a una temperatura de 45°C. La condensación de una molécula de MDA o 4-HDA con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol produce un cromóforo estable que, en presencia del ácido metanosulfónico presenta una absorbancia máxima a 586 nm.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Las concentraciones de MDA+4-HDA se corrigieron por las concentraciones de proteínas, expresando las concentraciones finales en nmol MDA+4-HDA/mg de proteína.

6.3.10.4. Protocolo de determinación

Consta de los siguientes pasos (Fig.65):

- Centrifugar las muestras a 3000 xg durante 10 minutos a 4°C.
- Dispensar 2 alícuotas de 200 µL del sobrenadante y añadir 650 µL de N-metil-2-fenilindol 10,3 mM disuelto en acetonitrilo, y metanol, en relación 1:3 (v/v).
- Agitar
- Dispensar 150 µL de ácido metanosulfónico 15,4 M.
- Incubar los tubos durante 40 minutos a 45°C.
- Centrifugar a 3000 xg durante 10 minutos a 4°C.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia a 586 nm en el espectrofotómetro.

Para obtener la recta de calibrado se utilizaron diluciones de concentración conocida (0-10 µmol/L) a partir de una disolución de 1,1,3,3-tetrametoxipropano 10 mM en TRIS 20 mM. El 1,1,3,3-tetrametoxipropano al hidrolizarse, libera MDA de forma estequiométrica.

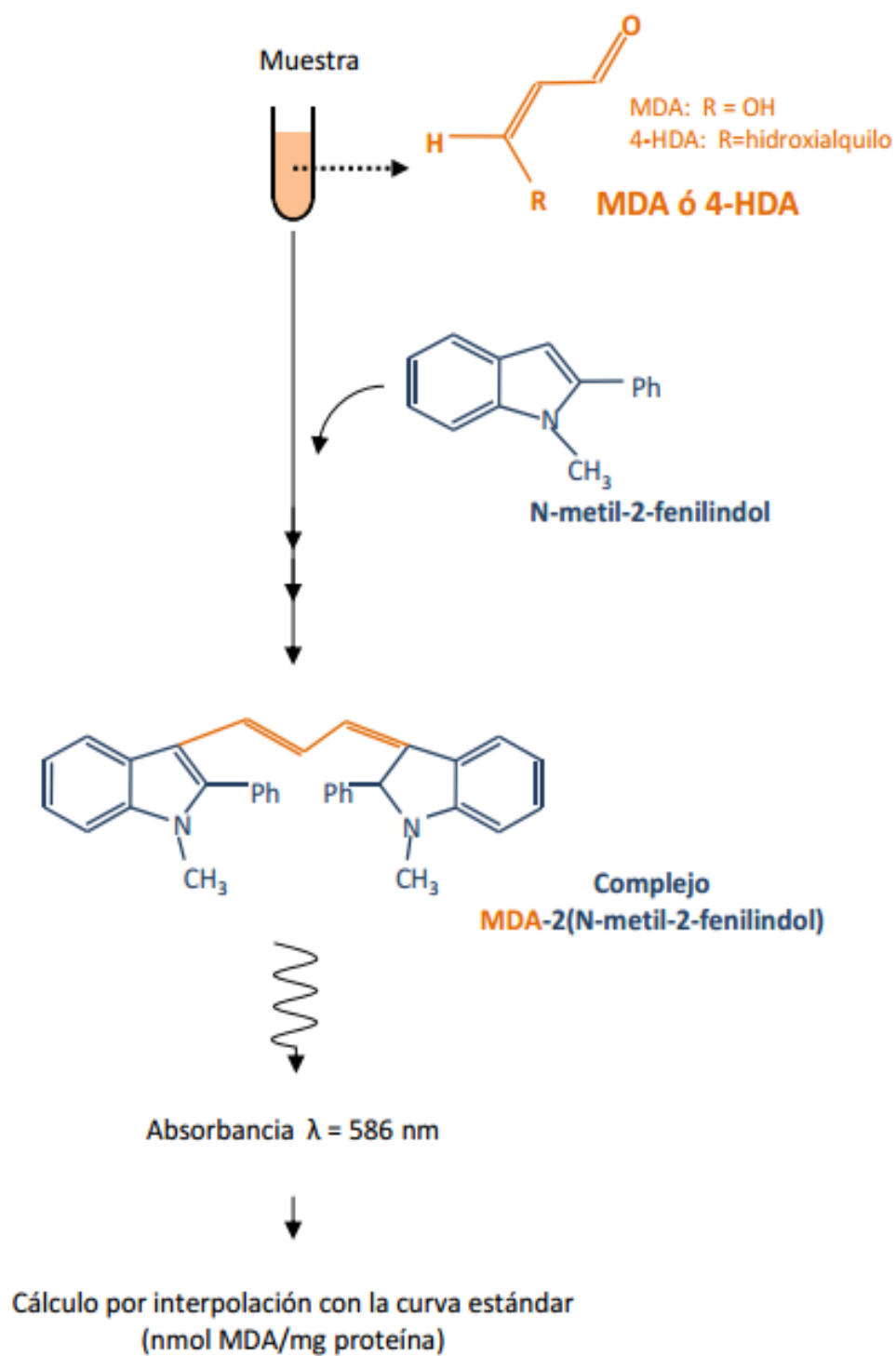


Fig.65. Protocolo de cuantificación de malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxialquenos (4-HDA)

6.3.10.5. Cuantificación de restos carbonilo

Para valorar el daño oxidativo a las proteínas de los homogeneizados, se utilizó la determinación de los restos carbonilo de las proteínas. Para ello se siguió el protocolo descrito por Levine y cols. (1990) con modificaciones mínimas. Este método está basado en la reacción de los restos carbonilo de las proteínas con la dinitrofenilhidracina (DNPH), formándose un derivado que se cuantifica midiendo su absorbancia en el rango 360-390 nm. Durante el procedimiento se utiliza el ácido tricloroacético (TCA) para la precipitación de las proteínas, los lavados para la eliminación del exceso de DNPH que no ha reaccionado con restos carbonilo, y la guanidina para redissolver las proteínas y poder realizar la lectura en el espectrofotómetro.

A partir de la absorbancia obtenida se calculó la concentración de restos carbonilo empleando la ley de Beer-Lambert y el coeficiente de absorción molar de la DNPH ($\epsilon = 22.000 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Finalmente, tras la determinación de las proteínas totales, los resultados se expresaron en nmol de restos carbonilo / mg de proteínas totales.

6.3.10.6. Protocolo para la determinación de restos carbonilo

Consta de los siguientes pasos (Fig.66):

- Añadir a 1mL de las muestras: 100 μL de TRIS 20 mM pH 7,4 y 200 μL de DNPH 10 mM en HCl 2N.
- Agitar e incubar durante 1 hora a 37°C.
- Dispensar 325 μL TCA 50% frío e incubar en hielo durante 10 minutos.
- Centrifugar a 3000 xg 10 minutos a 4°C.
- Lavar el precipitado 3 veces, resuspendiendo con 1 mL de etanolacetato de etilo 1:1, v:v y centrifugando a 11.000 xg durante 3 minutos a 4°C.
- Disolver el precipitado final en 700 μL de guanidina-HCl 6M pH=2,00.
- Agitar e incubar, a 37°C durante 15 minutos.
- Centrifugar a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C.
- Leer la absorbancia del sobrenadante a 375 nm en cubeta de cuarzo a temperatura ambiente. Utilizar como blanco una disolución de guanidina 6M.

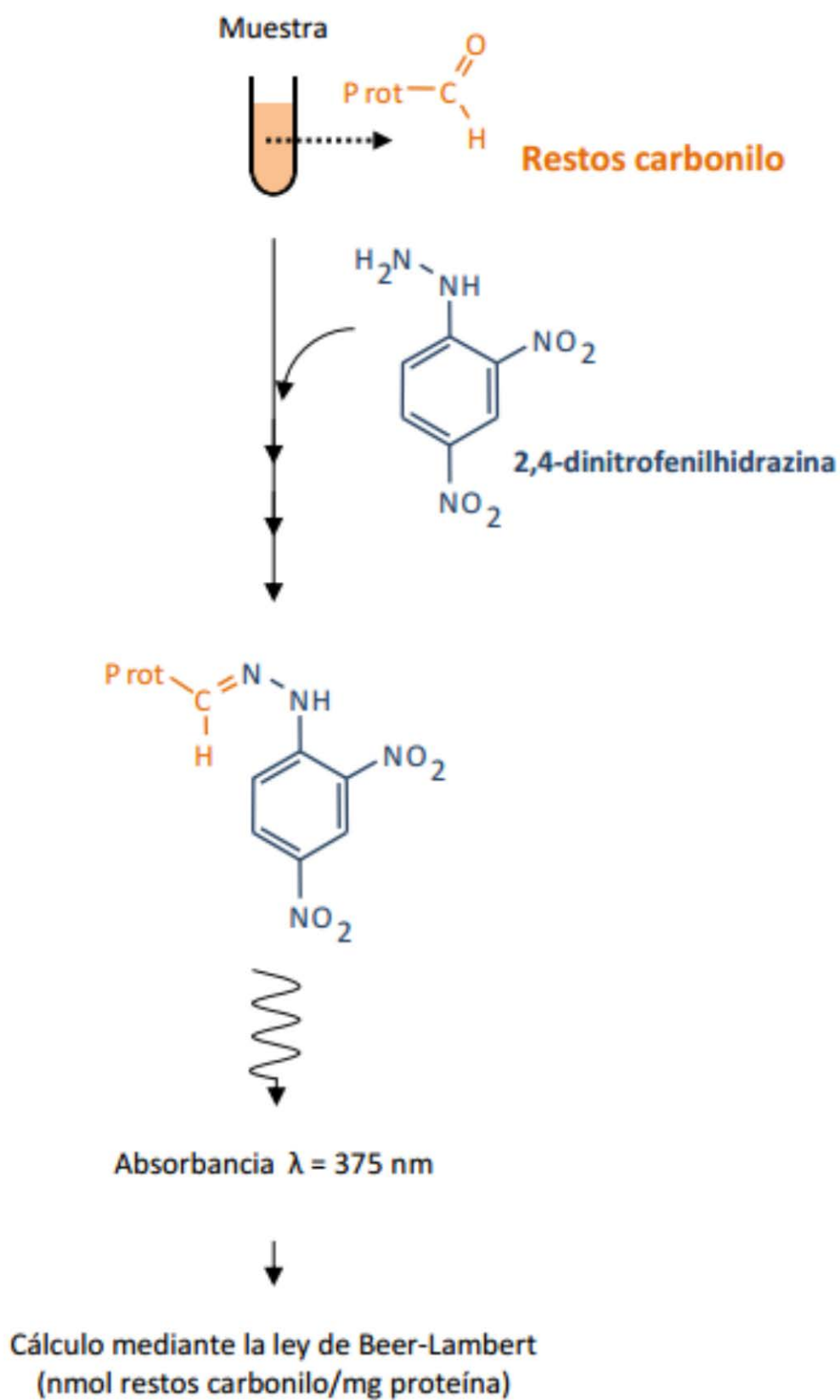


Fig.66. Fundamento de cuantificación de restos carbonilo en las proteínas.

6.3.10. PROCEDIMIENTO PARA LA MEDICIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN MUESTRA SANGUÍNEA

La medición de los parámetros serológicos de función hepática y de concentración lipídica en plasma se realizaron en los laboratorios de bioquímica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

Una vez centrifugada la sangre y extraído el plasma, se procedió a la identificación de la muestra. Las muestras de suero identificadas se introducen en los procesadores automáticos (Fig.67) destinados a la lectura automática de la concentración de lípidos y de parámetros de función hepática (Fig.68).

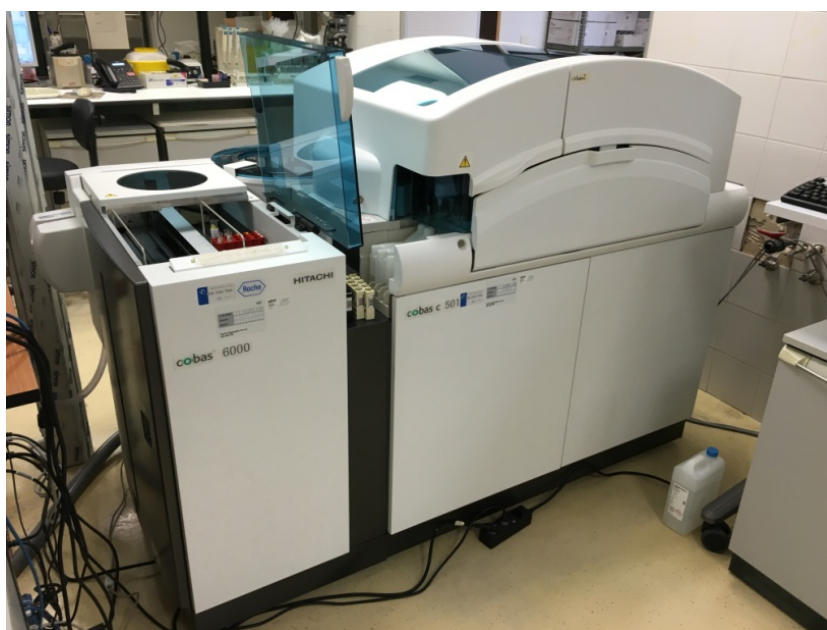


Fig.67. Analizador automático del laboratorio de bioquímica del HCU Lozano Blesa.

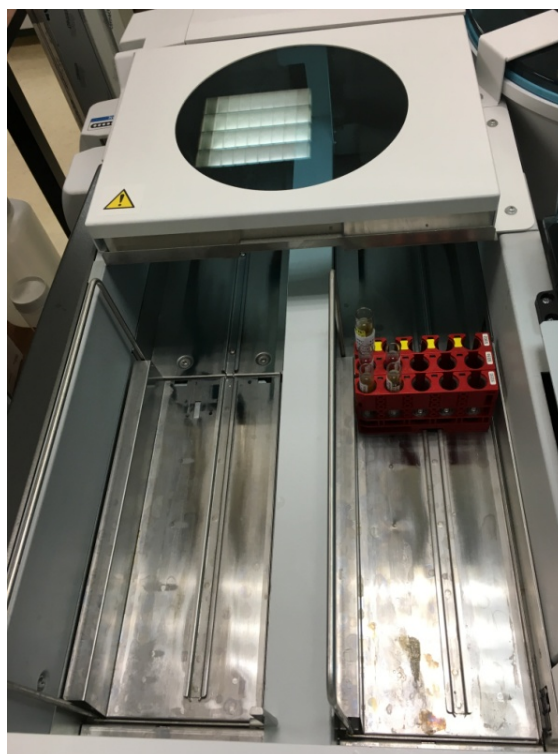


Fig.68. Zona del analizador automático donde se colocan las muestras en vacutainers.

6.3.11. PROCEDIMIENTO PARA EL ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA BIOPSIA HEPÁTICA

Para la determinación del grado de esteatosis hepática utilizamos dos métodos, un análisis semicuantitativo en el que el patólogo estima el porcentaje de esteatosis bajo visión directa de cada una de las muestras (Fig.69) y un método de cuantificación mediante análisis asistido por ordenador.

6.3.11.1. Análisis semicuantitativo por patólogo

El patólogo estima el área de la biopsia que está ocupada por grasa, expresando el resultado en porcentaje. La técnica de medición se suele basar en el conteo de hepatocitos con vacuolas de grasa con la ayuda de una rejilla, que se superpone a la muestra histológica. El número de rejillas ocupadas por hepatocitos esteatósicos en comparación con el total de la rejilla permite un mínimo de extrapolación a toda la muestra. Se trata de un método rápido y sencillo, pero se encuentra limitado por la

subjetividad del patólogo, por lo tanto se decidió utilizar otro método asistido por ordenador para determinar el grado de esteatosis. Además del grado de esteatosis, el patólogo estima la morfología de la esteatosis, distribución de la esteatosis y grado de fibrosis; parámetros que no podemos obtener a través del sistema informático.



Fig.69. Preparaciones con las muestras de los animales etiquetadas con número del animal y fecha, previo al examen histológico.

6.3.11.2. Análisis de imagen asistido por ordenador

En el trabajo empleamos un software específico asistido por *Matlab*®, creado por el propio grupo de investigación para realizar un análisis digital de las muestras de biopsias.

Tiene tres funciones fundamentales:

- *Cal-estea.m*: es la función principal que realiza el cálculo de la esteatosis.
- *Filtro-m*: función para el filtro de grises, que permite adaptar el programa a la amplia gama de tonalidades que se nos puede presentar en la muestra.
- *Region-m*: función que permite eliminar regiones que no correspondan a grasa (por ejemplo, venas con tonalidades blancas).

Utilizamos 4 fotografías por cerdo, obtenidas del estudio histológico a 10 aumentos de una preparación teñida con Hematoxilina-Eosina. Se tomó como eje una vena centrolobulillar y se tomó una fotografía cada 90° considerando la vena centrolobulillar (Fig.70).

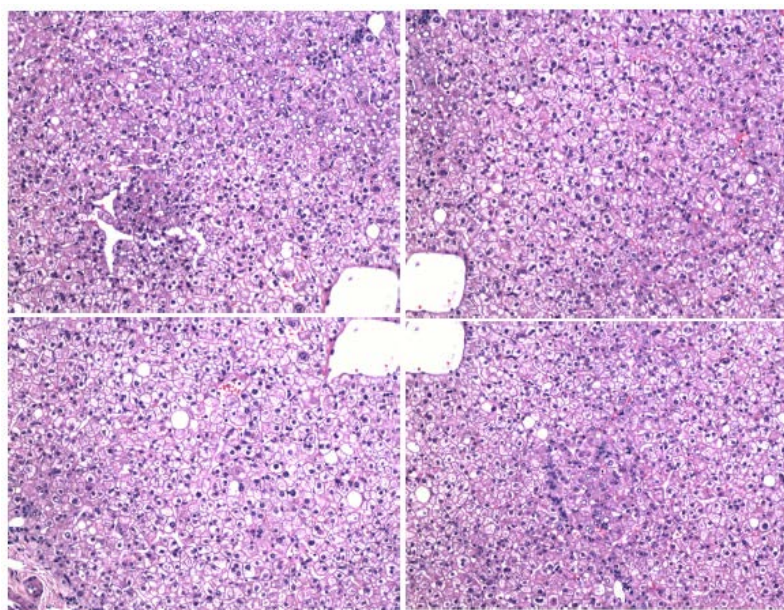


Fig.70. 4 fotografías seleccionadas del estudio histológico convencional de un cerdo. En el centro se observa la vena centrolobulillar y las cuatro fotografías cada 90° alrededor de la misma (HE 10X).

Para cada muestra obtenida, dado el amplio rango de tonalidades, el programa nos pide de inicio, y para cada fotografía, la selección de un punto de grasa (con el botón derecho), para calibrar su tolerancia de qué considerar o no grasa (Fig.71).

Se realizará una calibración del tono de la grasa (tolerancia).

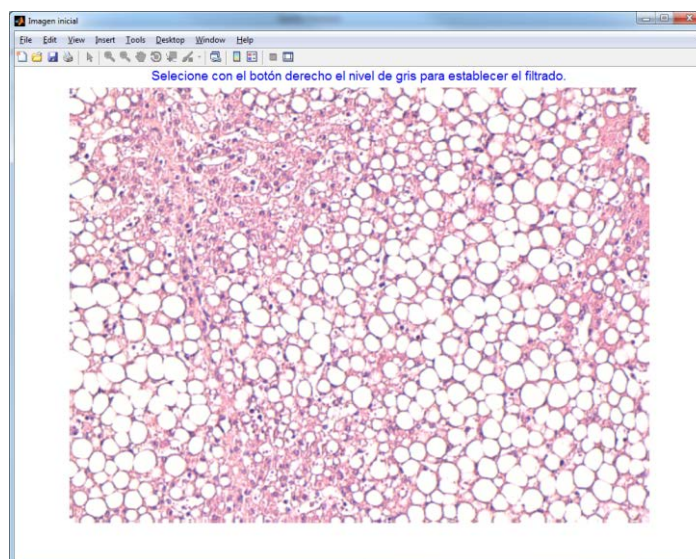


Fig.71. Imagen inicial a 10X, teñida con Hematoxilina-Eosina.

Se observa la vena centrolobulillar arriba a la derecha. Sobre la imagen inicial se selecciona el nivel de gris para realizar el balance.

Posteriormente, se realiza el cálculo inicial de la esteatosis. El programa nos ofrece una estimación del porcentaje de grasa de la fotografía (en color verde) si bien incluye falsos positivos (estructuras que se tiñen de blanco en la preparación pero no corresponden a gotas de grasa, como por ejemplo, estructuras vasculares) que deben ser eliminados manualmente (Fig.72). Clicando con el botón derecho en las regiones que son falsos positivos, podremos eliminarlas de la estimación de grasa, variando así el porcentaje.

Cada muestra o imagen se nombrará con el formato Suj1-foto2 10X.jpg, correspondiendo:

- Número de muestra: suj1
- Número de fotografía: foto2
- Aumentos: 10X
- Formato JPEG: .jpg

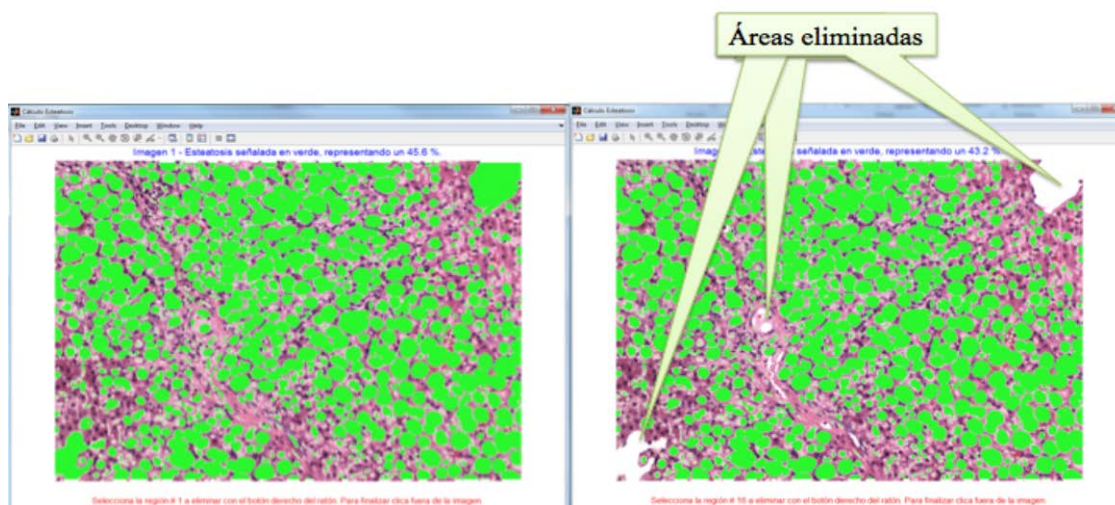


Fig.72. Imagen de esteatosis inicial, incluyendo falsos positivos, como la vena centrolobulillar y el pedículo portal que se eliminaron manualmente. Se observa como bajó el porcentaje de esteatosis de 45,6% a 43,2%.

El proceso se repite con las cuatro fotografías de cada paciente obteniendo como resultados los archivos independientes que se observan en la Fig.73

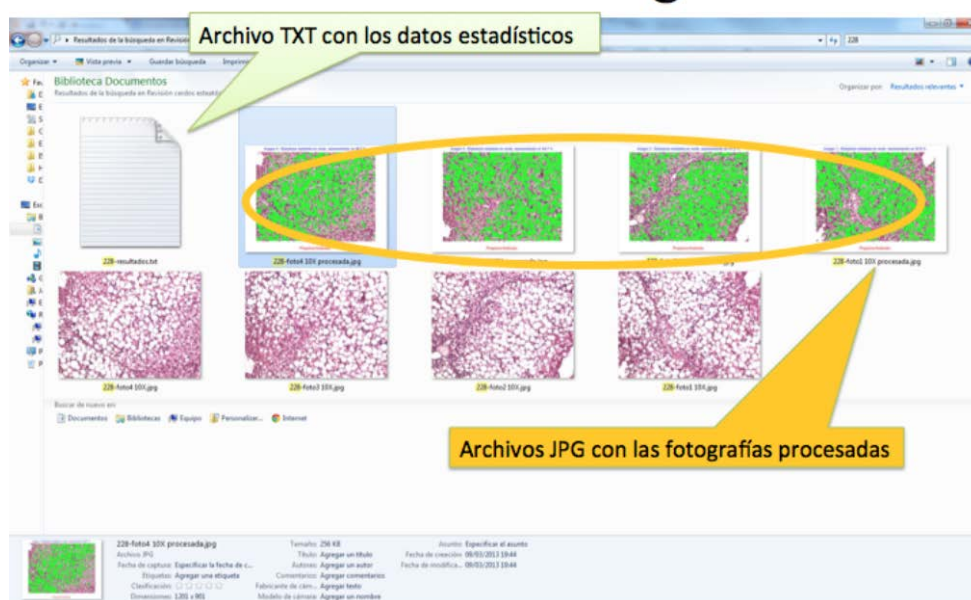


Fig.73. Representación de la carpeta de todos los archivos de cada paciente: archivo con datos estadísticos, archivos con las fotografías procesadas y archivos con las fotografías originales.

Las 4 imágenes procesadas, incluyendo el porcentaje de grasa calculado en cada una de ellas y un archivo de texto (txt) con media, desviación típica y valores individuales se representan en las Fig.74 y 75.

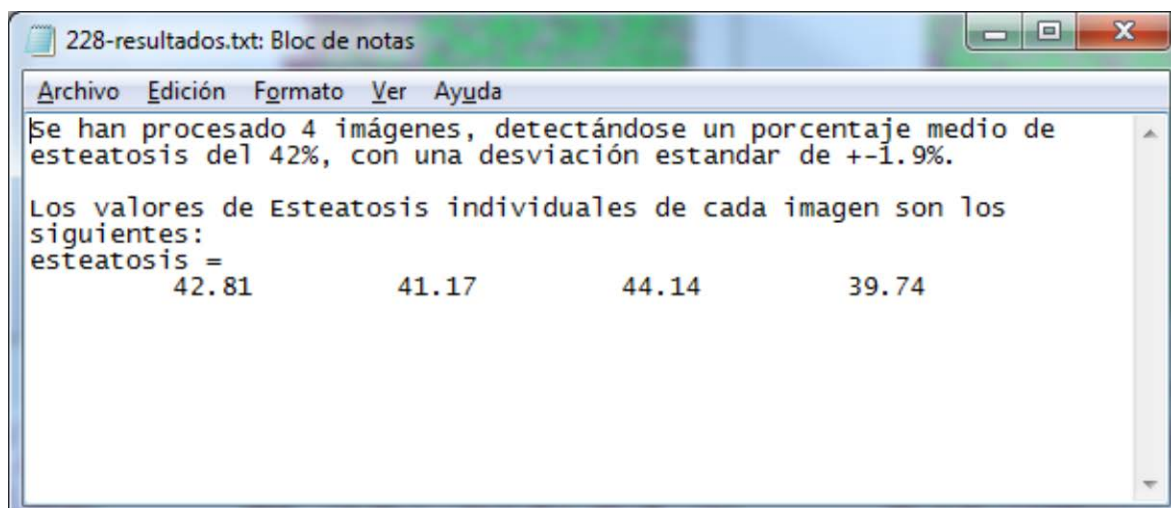


Fig.74. Archivo de texto con el resultado de la esteatosis de las 4 fotografías del mismo cerdo, así como el porcentaje de esteatosis media y la desviación estándar.

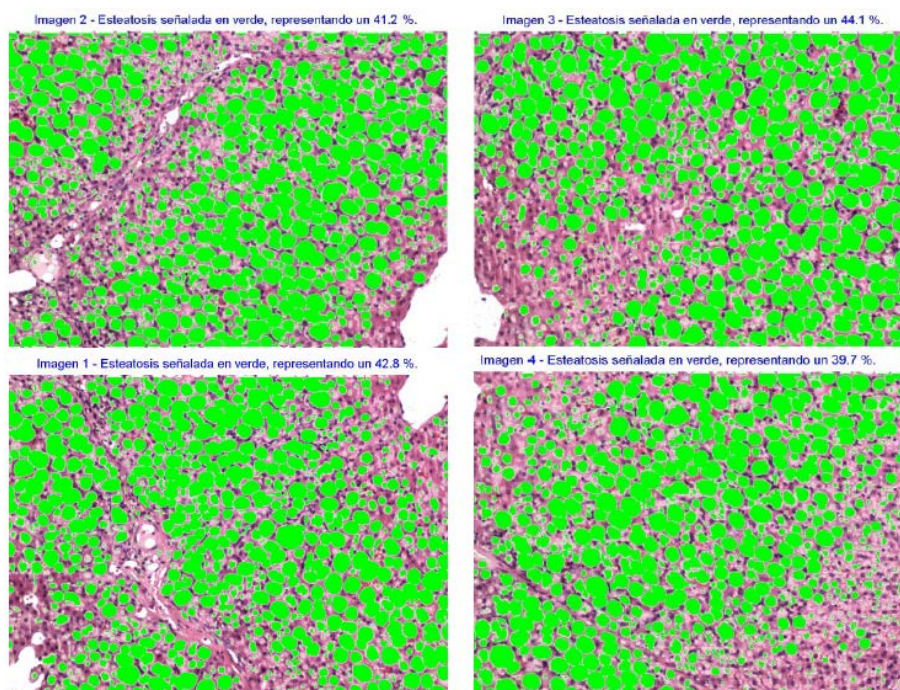


Fig.75. 4 fotografías estudiadas por el sistema informático. Centradas por la vena centrolobulillar (en blanco).

6.4. VARIABLES A ESTUDIO

Se estudiaron un total de 22 variables que las agrupamos en cuatro grupos. Todas las variables que se mencionan a continuación las medimos dos veces, en dos momentos diferentes (tras la administración de la dieta esteatósica 12 semanas, y tras la administración o no de la dieta y fármaco a las 4 semanas de la primera medición).

Los cuatro grupos en los que se pueden agrupar las 23 variables son los siguientes:

- Características generales.
- Estudio bioquímico de la muestra sanguínea.
- Análisis histológico de la biopsia hepática.
- Estudio bioquímico de estrés oxidativo de la biopsia hepática.

6.4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

1. Tamaño del hígado: hepatomegalia (sí/no). Variable cualitativa dicotómica con categorías independientes: sí o no. Hepatomegalia se considera aumento patológico del tamaño del hígado (límite inferior del hígado alcanza la línea de las costillas inferiores).
2. Bordes del hígado (romos/agudos). Variable cualitativa dicotómica con categorías independientes: romos o agudos. Este término hace referencia a la angulación del extremo del hígado, que adquiere una forma roma conforme alcanza mayor porcentaje de esteatosis.
3. Coloración general del hígado (amarillento/rojizo/pálido). Variable cualitativa policotómica con categorías independientes: amarillento, rojizo, pálido. Hace referencia al color macroscópico del hígado, que adquiere diferente tonalidad en función del grado de esteatosis, tornando a un color amarillento o pálido si el porcentaje de esteatosis es elevado.

4. Consistencia (blanda/dura). Variable cualitativa dicotómica con categorías independientes: blanda o dura. La consistencia es la resistencia del tejido hepático a la rotura o a la deformación.
5. Ascitis (sí/no). Variable cualitativa dicotómica con categorías independientes: sí o no. Ascitis se refiere a la acumulación de líquido seroso en la cavidad peritoneal resultado de la presión alta en los vasos sanguíneos del hígado.
6. Peso del animal (kg). Variable cuantitativa continua.

6.4.2. ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA MUESTRA SANGUÍNEA (SEROLOGÍA)

Del suero extraído de la muestra sanguínea, se analizan los siguientes parámetros:

7. Triglicéridos (mg/dl). Variable cuantitativa continua medida en mg/dl. Los triglicéridos son un tipo de glicerol que pertenecen a la familia de los lípidos o unión de tres ácidos grasos a una molécula de glicerina.
8. Colesterol total (mg/dl). Variable cuantitativa continua medida en mg/dl. El colesterol total es el lípido que se encuentra en plasma unido a lipoproteínas.
9. Colesterol HDL (mg/dl). Variable cuantitativa continua medida en mg/dl. El colesterol HDL es el tipo de colesterol que se encuentra unido en sangre a lipoproteínas de alta densidad.
10. Colesterol LDL (mg/dl) (colesterol total – colesterol HDL). Variable cuantitativa continua medida en mg/dl. El colesterol LDL es el colesterol que se encuentra unido en plasma a lipoproteínas de baja densidad.
11. Aspartato aminotransferasa - AST (UI/L). Variable cuantitativa continua medida en UI/L. La AST es una enzima aminotransferasa que se encuentra presente en muchos tejidos del organismo (hígado, corazón, músculos, riñones, cerebro).

Cataliza la transferencia de un grupo amino desde el L-aspartato al 2-oxoglutarato.

12. Alanina aminotransferasa - ALT (UI/L). Variable cuantitativa continua medida en UI/L. La ALT es una enzima aminotransferasa que se encuentra en gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos. Su elevación en plasma es más específica para el daño hepático que la AST. Cataliza la transferencia de un grupo amino desde la alanina al alfa-cetoglutarato.
13. Gamma glutamil transpeptidasa - GGT (UI/L). Variable cuantitativa continua medida en UI/L. La GGT es una enzima que juega un papel clave en el ciclo de la síntesis y degradación de glutatión. Está presente en las membranas celulares de muchos tejidos, incluyendo riñones, conducto biliar, páncreas, hígado, bazo, corazón, cerebro y vesículas seminales.
14. Fosfatasa alcalina – FA (UI/L). Variable cuantitativa continua medida en UI/L. La FA es una enzima hidrolasa responsable del proceso de fosforilación. Se encuentra en casi todos los tejidos, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón.
15. Bilirrubina (mg/dl). Variable cuantitativa continua medida en mg/dl. La bilirrubina es un pigmento biliar de color amarillo anaranjado que resulta de la degradación de la hemoglobina de los glóbulos rojos reciclados.

6.4.3. ESTUDIO BIOQUÍMICO DE ESTRÉS OXIDATIVO DE LA BIOPSIA HEPÁTICA

Otra de las muestras hepáticas fue congelada inmediatamente después de su extracción (mediante inmersión en nitrógeno líquido) para su posterior estudio de estrés oxidativo.

16. Malondialdehído+4-hidroxi-alquenal (MDA+4-HDA) (nmol MDA+4-HDA /mg de proteína). Variable cuantitativa continua medida en nmol MDA+4-HDA/mg de proteína. El malondialdehído y el 4-hidroxi-alquenal son productos finales del proceso de peroxidación lipídica (LPO). La concentración de MDA+4-HDA es un indicador del grado de peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas. Las concentraciones de MDA+4-HDA se corrigieron por las concentraciones de proteínas, expresando las concentraciones finales en nmol MDA+4-HDA/mg de proteína.
17. Carbonilos (nmol carbonilo/mg de proteínas). Variable cuantitativa continua medida en nmol carbonilo/mg de proteínas. Los carbonilos son los productos finales de la degradación oxidativa de las proteínas. Las concentraciones de carbonilos se corrigieron por las concentraciones de proteínas, expresando las concentraciones finales en nmol carbonilo/mg de proteínas.

6.4.4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LA BIOPSIA HEPÁTICA

Se estudiaron los siguientes parámetros:

18. Grado de esteatosis. Variable cuantitativa continua que toma valores de 0 a 100 y que hace referencia al porcentaje de esteatosis por unidad lobulillar determinado por un patólogo.
19. Grado de esteatosis según programa informático de tratamiento de imágenes. Variable cuantitativa continua que toma valores de 0 a 100 y que hace referencia al porcentaje de esteatosis determinado por el programa informático descrito anteriormente.
20. Distribución de la esteatosis (centrolobulillar/periférica). Variable cualitativa dicotómica con categorías independientes: centrolobulillar o periférica. Centrolobulillar hace referencia a la distribución de los adipocitos esteatósicos llenos de grasa en torno a la vena centrolobulillar. Periférica hace referencia a la distribución de los adipocitos esteatósicos en la zona periférica de los lobulillos hepáticos, es decir, cercanos a los septos o a los espacios porta.

21. Morfología de la esteatosis (macro/microesteatosis). Variable cualitativa dicotómica con categorías independientes: macro o microesteatosis. También se puede denominar macro o microvesicular ó macro o microgotular. La esteatosis microvesicular es un cuadro histológico que describe la acumulación de microvacuolas grasas en el citoplasma de los hepatocitos, que no desplazan al núcleo celular, y que su tamaño generalmente es menor de un micrón. La esteatosis macrovesicular se refiere a la coalescencia de múltiples microvacuolas en el citoplasma del hepatocito, que suelen desplazar el núcleo celular hacia la periferia.
22. Grado de fibrosis (se valora NO/SI (de 1 a 3)). Variable cualitativa policotómica con categorías posibles 0, 1, 2, 3. La fibrosis hepática es el desarrollo en exceso de tejido conectivo fibroso en el hígado, como consecuencia de un proceso reparativo o reactivo a un proceso inflamatorio crónico.

6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realiza en primer lugar un análisis descriptivo de las variables a estudio. Para variables cualitativas se aportan frecuencias relativas y absolutas. Para variables cuantitativas media y desviación estándar (DE), y mediana junto con el rango intercuartílico (RIQ). Los datos se representan de forma gráfica también, utilizando un diseño u otro según la naturaleza de las variables.

Para analizar la relación entre las variables a estudio, se lleva a cabo un análisis bivalente. Para estudiar la relación lineal entre dos variables cuantitativas, se utiliza el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman. El coeficiente de correlación puede tomar valores entre -1 y 1, indicando el 0 nula correlación entre las variables a estudio. Para evaluar las diferencias entre la primera biopsia o pre y la segunda biopsia o post, en relación a las variables cuantitativas del estudio, se utilizan métodos de comparación de medias para muestras relacionadas, Wilcoxon cuando la variable no sigue distribución normal, y T de Student cuando existe normalidad. Para

cuantificar la diferencia entre ambos tiempos, se calcula el porcentaje de cambio, tal y como se muestra, resultados positivos indicarán aumento de los valores en la biopsia post y resultados negativos disminución.

$$\% \text{ Cambio} = \frac{\text{Post} - \text{Pre}}{\text{Pre}} \times 100$$

Para estudiar la relación entre el grupo de inclusión de los animales de experimentación y la reversión de la esteatosis y otras variables cuantitativas del estudio, se utilizan métodos de comparación de medias para muestras independientes. Para dos grupos independientes se utiliza el Test de U de Mann-Whitney o el test de T de Student, según criterios de normalidad. Para k grupos independientes se utiliza el test de Kruskal-Wallis o ANOVA, según criterios de normalidad. Se evalúa la normalidad de las variables cuantitativas con la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Se realizan posteriormente modelos de regresión lineal múltiple para estudiar el efecto de la dieta y el tratamiento sobre las variables cuantitativas dependientes del estudio.

Se estableció el nivel de significación estadística para un p valor menor de 0,05. Para toda la investigación se utilizará el programa estadístico SPSS 22.0 para Windows (SPSS Ibérica, Madrid, España).

6.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS, FINANCIACIÓN Y CONFLICTO DE INTERESES

El estudio fue aprobado y autorizado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (Anexo 1).

El estudio ha sido financiado con fondos propios del grupo de investigación consolidado B-50 del IACS y fondos aportados por la investigadora.

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

7. RESULTADOS

En nuestro estudio participaron un total de 41 animales que se recibieron en tres tandas entre 2012 y 2015. 35 animales iniciaron dieta esteatósica y 6 animales formaron parte del grupo control. De los 35 animales que iniciaron la dieta esteatósica, 4 animales murieron después de la primera biopsia por complicaciones intra o postoperatorias. Estos 4 animales se repusieron para no afectar al tamaño muestral. Por lo tanto, los 4 grupos de estudio los formaron 31 animales (Fig.76).

Se perdieron 4 animales en el estudio:

- Uno de los animales murió por complicaciones intraoperatorias debido a la perforación del estómago durante la inducción anestésica, por lo que este animal fue sacrificado.
- Tres de ellos murieron en el postoperatorio inmediato de la primera intervención (primeras 48 horas). A dos de ellos se les practicó autopsia.
 - Uno de ellos presentó una obstrucción intestinal alta debido a una intususcepción de intestino delgado.
 - El otro animal presentó una peritonitis aguda difusa sin poder determinar la causa de dicha infección intraabdominal.

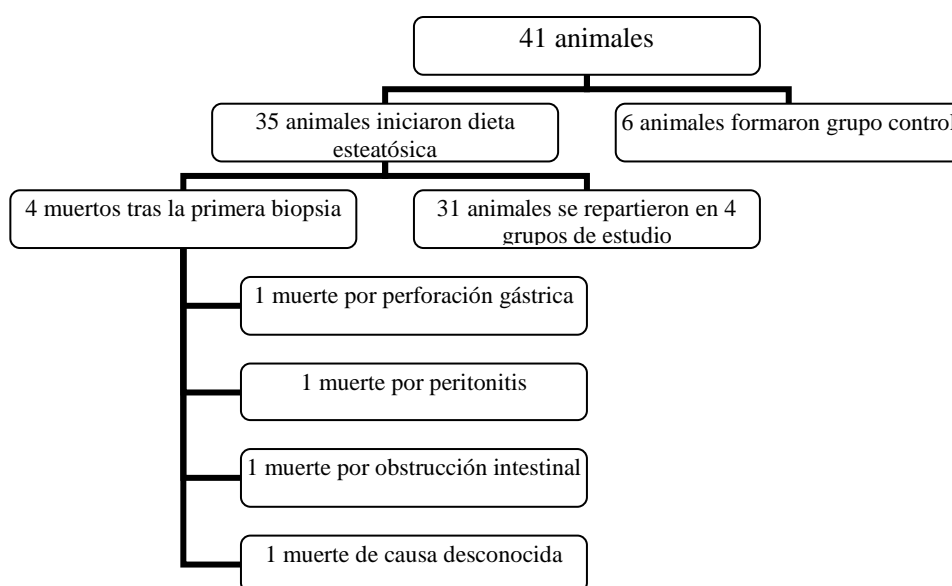


Fig.76. Esquema que resume la distribución de animales en los diferentes grupos.

Además de la mortalidad, cabe destacar la morbilidad que presentaron los animales a lo largo del estudio. Toda la morbilidad que se observó estaba en relación con complicaciones de la herida quirúrgica, y estuvo presente en 10 de los animales del grupo de estudio.

- Hubo 7 infecciones superficiales de la herida quirúrgica (3 del grupo 1, 3 del grupo 2 y 1 del grupo 3).
- Hubo 1 animal con una eventración, perteneciente al grupo 1.
- Hubo 2 animales con dehiscencia de la herida cutánea, con integridad del plano muscular, ambos pertenecientes al grupo 2.

7.1. GRUPOS DE ESTUDIO

Se utilizaron 6 animales para formar un grupo control, utilizándose animales sanos, que se alimentaron de dieta estándar, a los que se intervino para obtener muestras de sangre y de tejido hepático. Los datos obtenidos de estos animales sanos sirvieron como referencia para la comparación de los datos obtenidos en los cerdos tratados. El resto de animales (31) formaron el grupo de estudio, y se les indujo una esteatosis hepática por medio de una dieta especial. Una vez obtenidos animales con esteatosis y comprobado el grado de esteatosis mediante biopsia quirúrgica, éstos fueron adscritos a los 4 grupos que se detallan a continuación. La distribución de los animales en cada grupo se observa en la Fig.77.

Grupo 1: Animales con esteatosis hepática que continuaron la dieta y fueron tratados con melatonina (n=12).

Grupo 2: Animales con esteatosis hepática que continuaron la dieta pero no fueron tratados con melatonina (n=9).

Grupo 3: Animales con esteatosis hepática que discontinuaron la dieta y fueron tratados con melatonina (n=5).

Grupo 4: Animales con esteatosis hepática que discontinuaron la dieta y no fueron tratados con melatonina (n=5).

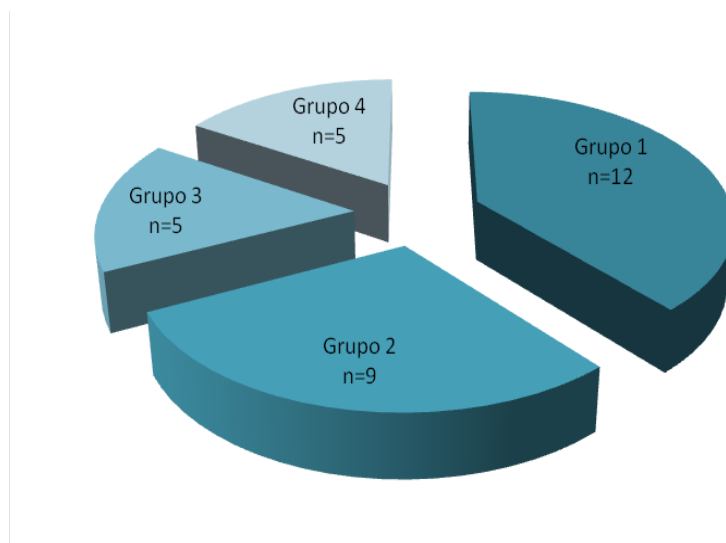


Fig.77. Distribución de los animales en los 4 grupos de estudio.

7.2. DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA

En los hígados esteatósicos se valoraron una serie de características macroscópicas:

- Tamaño del hígado.
- Bordes del hígado.
- Coloración general del hígado (en comparación con el color del bazo).
- Consistencia
- Presencia de ascitis

En la primera biopsia, todos los animales de los 4 grupos de estudio presentaron un hígado ligeramente aumentado de tamaño, de bordes romos, de aspecto amarillento (Fig.78) y consistencia blanda. 11 de los 31 animales presentaban ascitis (35,48%), como se muestra en la Fig.79.

Por el contrario, los 6 animales del grupo control (no esteatósicos) presentaban un hígado de tamaño normal, bordes agudos, coloración rojiza y de consistencia dura, y solo uno de ellos (16,67%) presentaba ascitis (Fig.80).

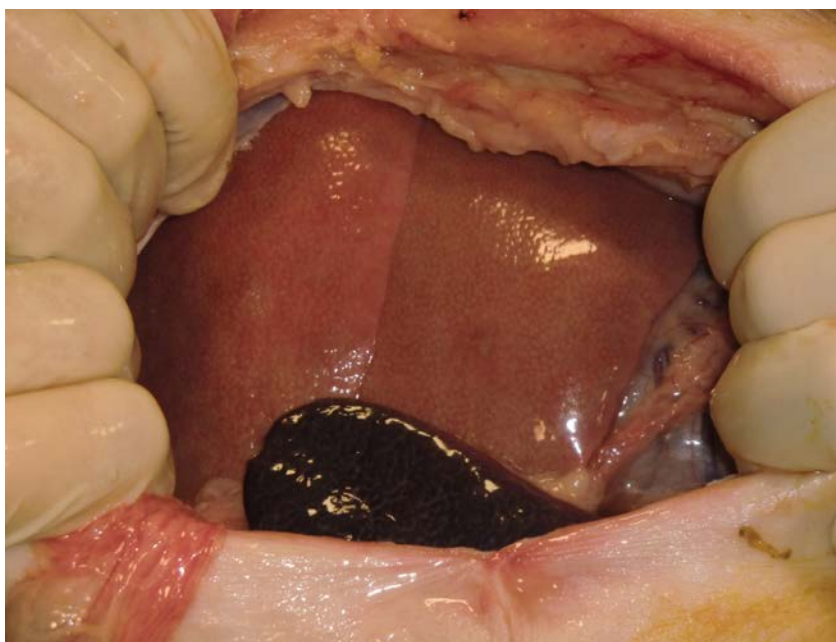


Fig.78. Aspecto macroscópico de un hígado perteneciente a un animal del grupo de estudio tras dieta esteatósica. Se aprecia el contraste entre el color intensamente amarillento del hígado y el color violáceo del bazo.

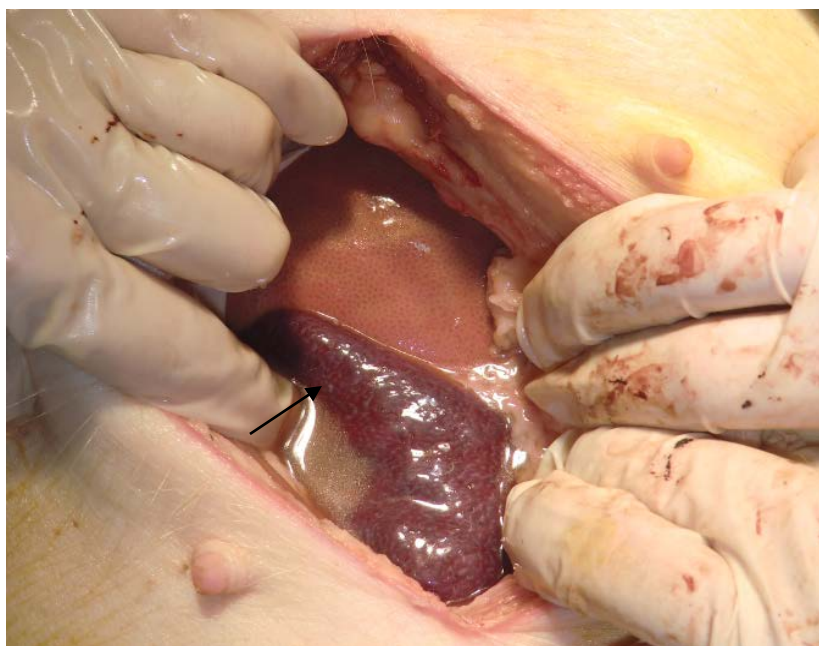


Fig.79. Presencia de ascitis en uno de los animales del grupo estudio (flecha). Se observa también el color intensamente amarillento, en contraste con el color violáceo del bazo.

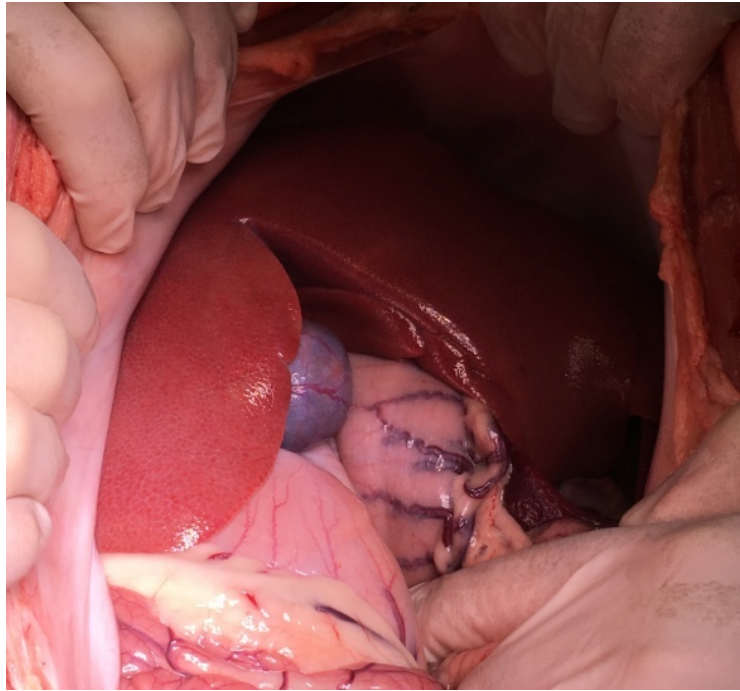


Fig.80. Aspecto macroscópico de un hígado perteneciente a un animal del grupo control. Se aprecia la coloración rojiza y los bordes agudos.

En la segunda biopsia, el tamaño del hígado estaba aumentado en 29 animales (93,55%). Los bordes hepáticos eran romos en 28 de los animales (90,32%). El color del hígado seguía siendo amarillento en 21 animales (67,74%). La consistencia del hígado era dura en 6 de los animales (19,35%). En ninguno de ellos se observó la presencia de ascitis.

7.3. ESTEATOSIS ALCANZADA

El total de los 31 (100%) animales del grupo estudio, presentaron esteatosis hepática significativa tras haber seguido la dieta especial durante 3 meses.

La valoración del grado de infiltración grasa se realizó por dos métodos:

- 1- Visión directa por el patólogo
- 2- Análisis digital de imagen por programa informático

La distribución de los animales en los diferentes grupos de estudio fue aleatoria, sin tener en cuenta el grado de esteatosis alcanzada. En la Fig.81 se muestra el grado de esteatosis alcanzada por cada uno de los 31 animales del grupo estudio según análisis por patólogo y según análisis digital de imagen.

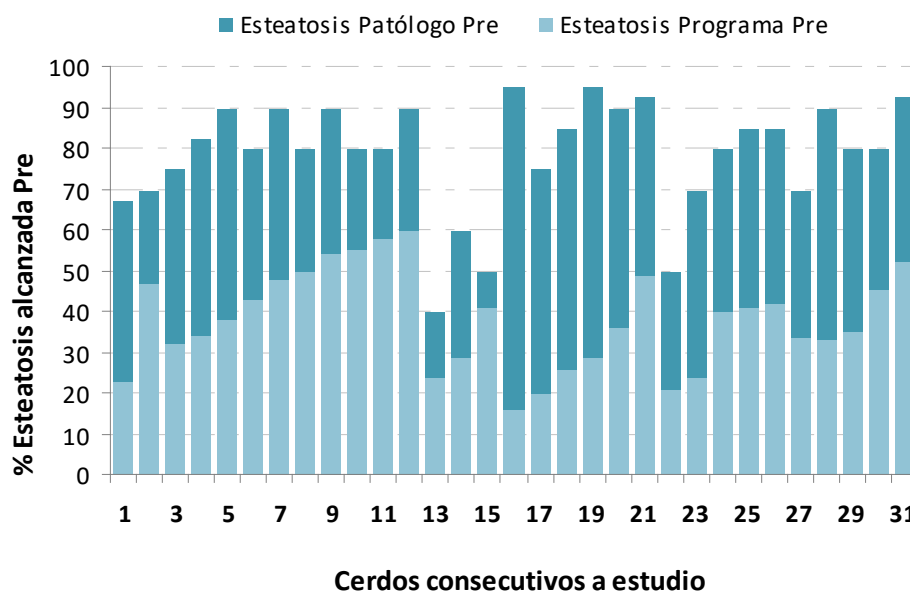


Fig.81. Esteatosis alcanzada por cada uno de los cerdos del estudio, según patólogo y según programa.

En la Fig.82 se muestra la media del grado de esteatosis de los animales por cada uno de los grupos de estudio según análisis por patólogo y según análisis digital de imagen. No existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la media de esteatosis alcanzada por grupo.

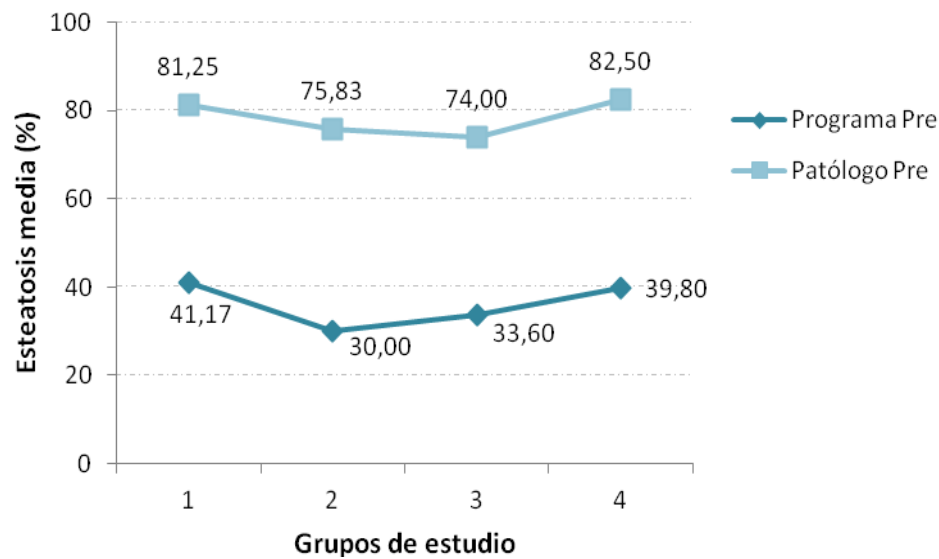


Fig.82. Esteatosis media alcanzada por cada uno de los grupos, según patólogo y según programa.

Se observa que el grado de esteatosis según análisis digital aporta en todos los casos unos valores medios inferiores a los aportados según análisis por patólogo. De media el grado de esteatosis según patólogo puntúa 40,68 (DE=14,66) más que según análisis digital en el momento pre y 36,87 (DE=13,45) más en el momento post.

En la Fig.83 se observa la imagen de microscopía óptica que corresponde al animal que alcanzó el mayor porcentaje de esteatosis visto por patólogo (95% de esteatosis). La mayoría de hepatocitos presentan degeneración grasa, sólo se observan pequeñas áreas de hepatocitos conservados en la periferia del lobulillo.

En la Fig.84 se observa la imagen de microscopía óptica que corresponde al animal que alcanzó el menor grado de esteatosis visto bajo visión directa por patólogo (40% de esteatosis).

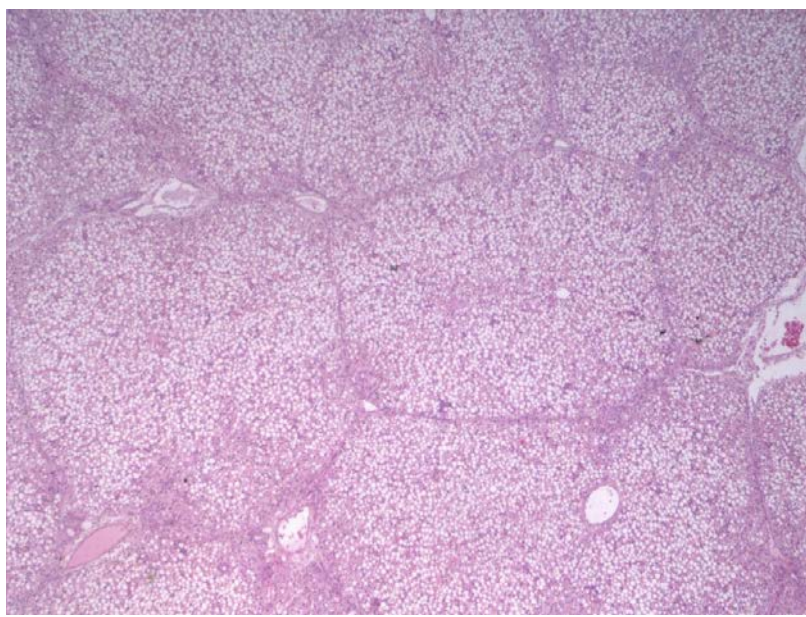


Fig.83. Imagen de microscopía óptica, tinción HE 2x donde se observa una esteatosis del 95%.

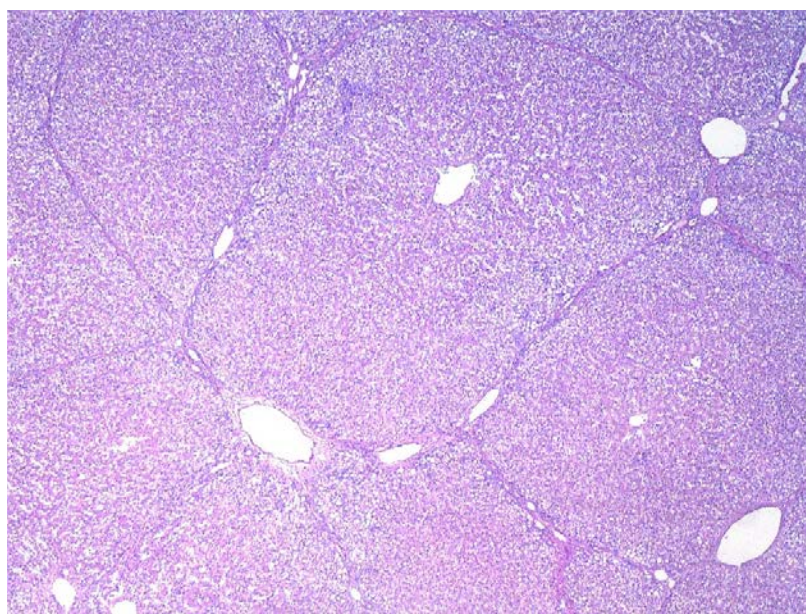


Fig.84. Imagen de microscopía óptica, tinción HE 2x donde se observa una esteatosis del 40%.

7.4. PESO

Los animales del grupo control pesaban de media 39,65 Kg, el que menos pesaba 34,00 Kg y el que más 48,20 Kg. Un 50% de los cerdos del grupo control pesaba 38,50 Kg o más.

El peso medio de los animales, tras terminar el período de administración de dieta esteatósica de tres meses (primera biopsia o tiempo pre) fue de 50,12 (DE=6,92) Kg, con un máximo de 63,55 Kg y un mínimo de 34,75 Kg. Un 50% de los cerdos pesaba 47,50 Kg o más.

Tras terminar el periodo de estudio (segunda biopsia o tiempo post) se observó un aumento de peso, la media asciende a 53,77 (DE=9,82) Kg, el 50% de los cerdos pesa en ese momento 49 Kg o más.

La diferencia de peso en los dos tiempos de estudio (primera biopsia o pre y segunda biopsia o post) para todo el grupo es estadísticamente significativa ($p<0,001$). De media los animales engordan 3,65 Kg. (DE=4,48) durante el mes que permanecieron en estudio.

En la Fig.85 se observa el peso medio en los dos tiempos de estudio (primera biopsia o pre y segunda biopsia o post) por grupos de estudio.

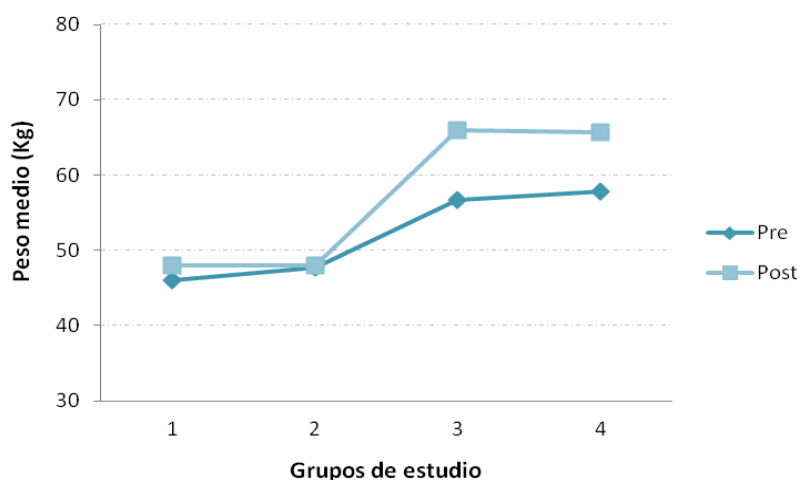


Fig.85. *Peso medio (Kg) pre-post por grupos de estudio.*

Se observa que existe un aumento de la media de peso en todos los grupos.

Tal y como se observa en la Tabla 2, se han evaluado las diferencias en la variable peso dentro de cada grupo en los dos tiempos de estudio (primera biopsia o pre y segunda biopsia o post). En todos los grupos se estudió la diferencia (peso al final del estudio – peso al inicio del estudio) y el porcentaje de cambio (% de diferencia del peso al final del estudio respecto del peso al inicio del estudio), calculado de la siguiente forma:

$$\% \text{ Cambio Peso} = \frac{\text{Peso Post} - \text{Peso Pre}}{\text{Peso Pre}} \times 100$$

También se han evaluado las diferencias existentes en la variable peso entre los grupos en cada uno de los tiempos de estudio (pre y post). Interesa principalmente la comparación entre los grupos 1-2 para evaluar el efecto de la melatonina sobre los animales que continúan con la dieta, y la comparación entre los grupos 3-4 para evaluar el efecto de la melatonina sobre los animales sin dieta esteatósica. También interesa la comparativa entre los grupos 1-3 para evaluar el efecto de la discontinuación de la dieta en los dos grupos de animales que han sido tratados con melatonina, y la comparación entre los grupos 2-4 para evaluar el efecto de la discontinuación de la dieta en los dos grupos de animales que no han sido tratados con melatonina.

Tabla 2. Peso en Kg de los animales por grupos. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	Diferencia (*)	%Cambio (**)
Control	39,65 (5,71)				
	38,50 (9,77)				
1	45,98 (3,46)	48,03 (3,20)	0,003	2,04 (1,07)	4,52 (2,48)
	45,55 (3,38)	47,50 (3,00)		2,00 (1,44)	4,62 (3,78)
2	47,69 (7,14)	48,01 (6,84)	0,677	0,31 (2,04)	0,91 (4,81)
	47,50 (6,76)	46,70 (9,00)		0,50 (3,95)	0,82 (8,02)
3	56,70 (3,55)	66,00 (6,52)	0,043	9,30 (5,58)	16,58 (9,87)
	58,10 (6,60)	65,00 (13,00)		10,65 (10,68)	21,58 (18,42)
4	57,83 (3,55)	65,70 (4,47)	0,043	7,87 (3,55)	13,72 (6,42)
	57,35 (6,00)	65,00 (7,00)		8,95 (4,90)	15,08 (9,84)
p valor					
Global ^b	0,001	<0,001		0,002	0,003
1-2 ^c	0,169	0,651		0,058	0,058
3-4 ^c	1,000	1,000		0,421	0,421
1-3 ^c	0,001	<0,001		0,015	0,014
2-4 ^c	0,012	0,002		0,007	0,007

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

*Diferencia Peso = Peso Post – Peso Pre

**% Cambio Peso = $\frac{\text{Peso Post} - \text{Peso Pre}}{\text{Peso Pre}} \times 100$

En todos los grupos hay un aumento del peso medio entre los dos tiempos evaluados, siendo este aumento estadísticamente significativo en todos los grupos salvo en el grupo 2 (animales que continuaron con la dieta esteatósica sin recibir melatonina).

La diferencia de peso y el porcentaje de cambio también difieren de manera estadísticamente significativa entre los grupos 1-3 (ambos grupos se han tratado con melatonina, el grupo 1 ha continuado la dieta y el grupo 2 no) y 2-4 (ambos grupos no han sido tratados con melatonina, el grupo 2 ha continuado la dieta y el grupo 4 no). Se observa por tanto que los animales que discontinúan la dieta tienen un aumento mayor de peso que los animales que la continúan, por lo que sí existe un efecto significativo de la dieta, y no del tratamiento en la evolución del peso del animal (ya que la comparación de los grupos 1-2 y de los grupos 3-4 no es significativa).

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la dieta y no del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio del peso, tal y como se muestra en la Tabla 3. Podemos decir que de forma significativa los pacientes con dieta disminuyen en 12,42 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio del peso.

Tabla 3. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente %Cambio Peso.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	13,47	1,96	0,000	9,46	17,48
Dieta	-12,42	2,07	0,000	-16,66	-8,18
Melatonina	3,37	1,94	0,094	-0,62	7,35

$$\%Cambio\ Peso = 13,47 - 12,42xDieta + 3,37xMelatonina$$

No se observa relación según el coeficiente de correlación de Spearman ($r=0,090$) entre el grado de esteatosis al inicio y la ganancia de peso del animal ($p=0,630$) expresada mediante porcentaje de cambio.

7.5. ANÁLISIS SEROLÓGICOS

Se estudiaron diferentes parámetros serológicos de metabolismo lipídico y función hepática. Cada parámetro se evaluó en los dos tiempos de estudio. Para todos ellos se evaluó el porcentaje de cambio.

Son los siguientes:

- Triglicéridos (TG)
- Colesterol total (Col)
- Lipoproteínas de alta densidad (HDL)
- Lipoproteínas de baja densidad (LDL)
- Bilirrubina (B)
- Aspartato aminotransferasa (AST)
- Alaninaaminotransferasa (ALT)
- Gammaglutamiltranspeptidasa (GGT)
- Fosfatasa alcalina (FA)

7.5.1. ANÁLISIS SEROLÓGICO POR GRUPOS

Los siguientes gráficos (Fig.86, Fig.87, Fig.88, Fig.89) muestran el valor medio pre y post de cada uno de los parámetros evaluados para cada uno de los grupos de estudio.

GRUPO 1

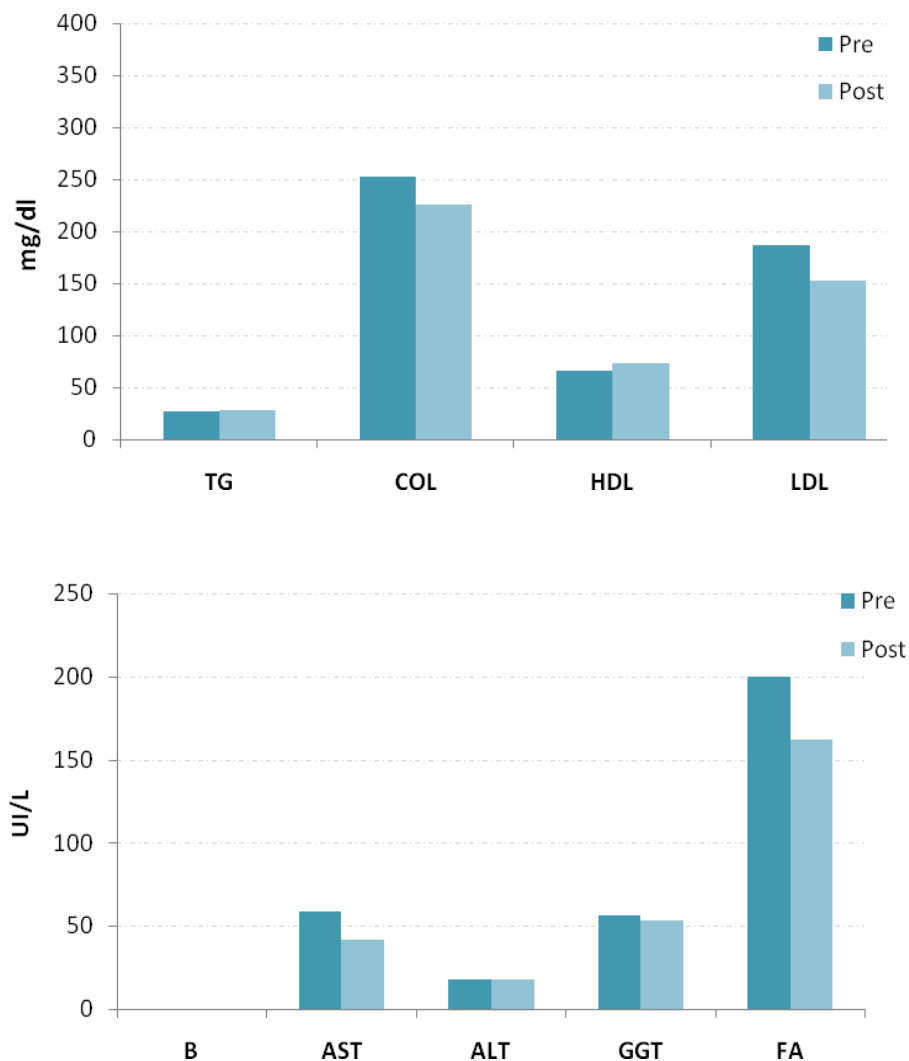


Fig.86. Valores medios de los parámetros pre-post para el Grupo 1.

TG= triglicéridos, COL= colesterol total, HDL= colesterol HDL, LDL= colesterol LDL, B= bilirrubina, AST=aspartato aminotransferasa, ALT= alanino aminotransferasa, GGT= gamma glutamil transferasa, FA= fosfatasa alcalina.

En el grupo 1 (grupo que continuó con la dieta esteatósica y se trató con melatonina) ningún parámetro muestra diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) pre y post tratamiento.

GRUPO 2

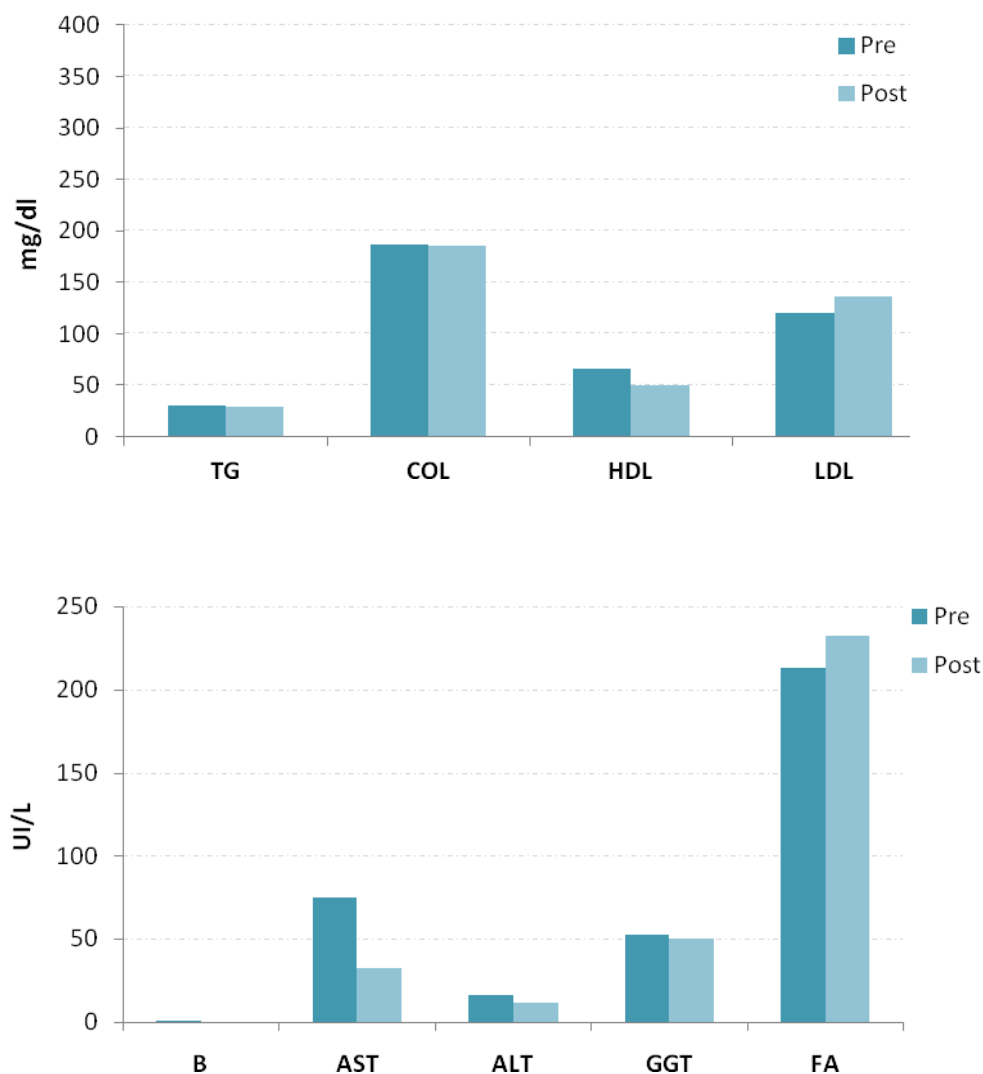


Fig.87. Valores medios de los parámetros pre-post para el Grupo 2.

TG= triglicéridos, COL= colesterol total, HDL= colesterol HDL, LDL= colesterol LDL, B= bilirrubina, AST=aspartato aminotransferasa, ALT= alanino aminotransferasa, GGT= gamma glutamil transferasa, FA= fosfatasa alcalina.

En el grupo 2 (grupo que continuó con la dieta esteatósica y no se trató con melatonina) disminuyó la media de AST de forma significativa ($p=0,008$), pasando de 75,11 (DE=47,29) a 32,67 (DE=13,93), también se observa una disminución significativa ($p=0,017$) de la media de B pasando de 0,73 (DE=0,83) a 0,22 (DE=0,26).

GRUPO 3

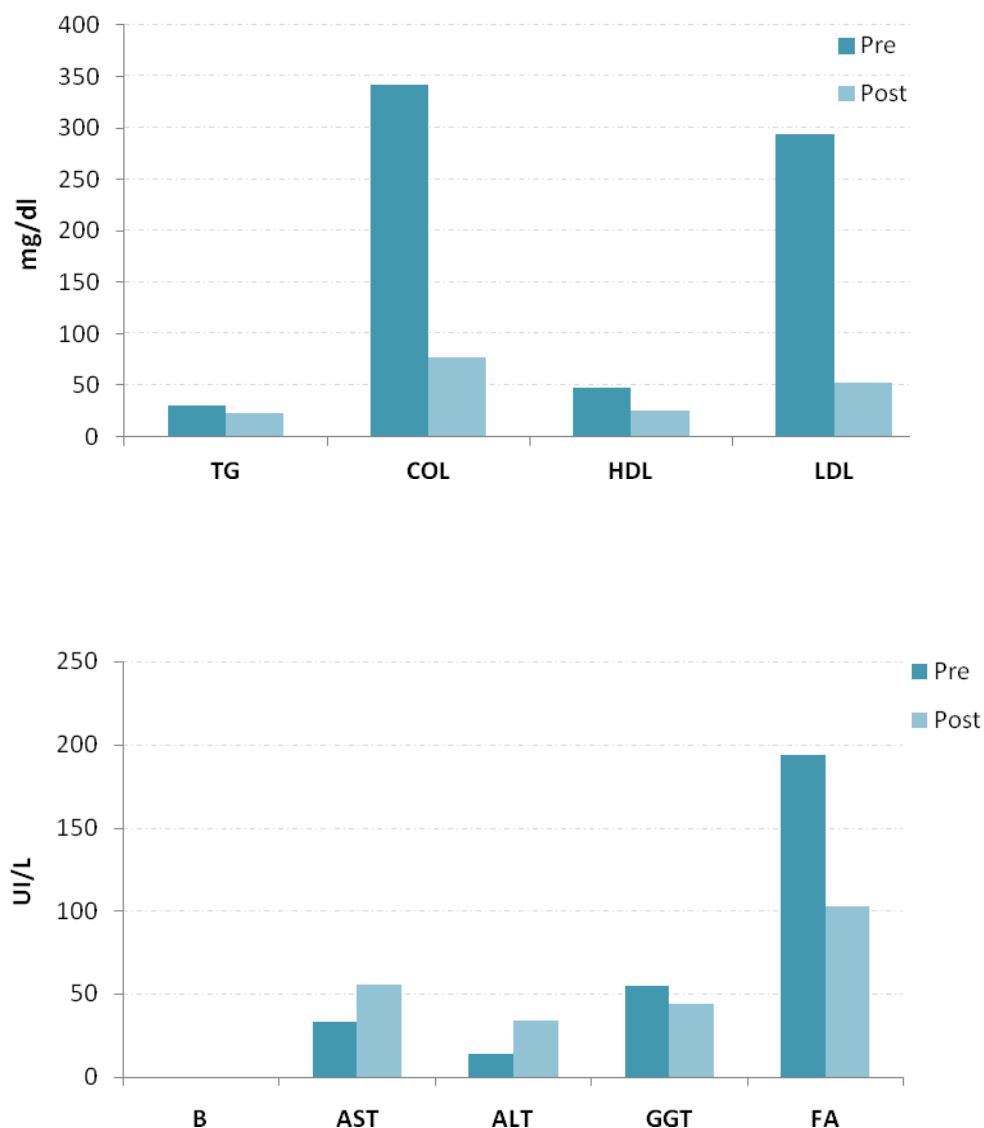


Fig.88. Valores medios de los parámetros pre-post para el Grupo 3.

TG= triglicéridos, COL= colesterol total, HDL= colesterol HDL, LDL= colesterol LDL, B= bilirrubina, AST=aspartato aminotransferasa, ALT= alanino aminotransferasa, GGT= gamma glutamil transferasa, FA= fosfatasa alcalina.

En el grupo 3 (grupo que discontinuó la dieta y se trató con melatonina) los valores medios de Colesterol total, HDL, LDL, ALT así como de GGT disminuyeron al final del periodo de estudio de forma estadísticamente significativa, comparados con los valores al inicio.

GRUPO 4

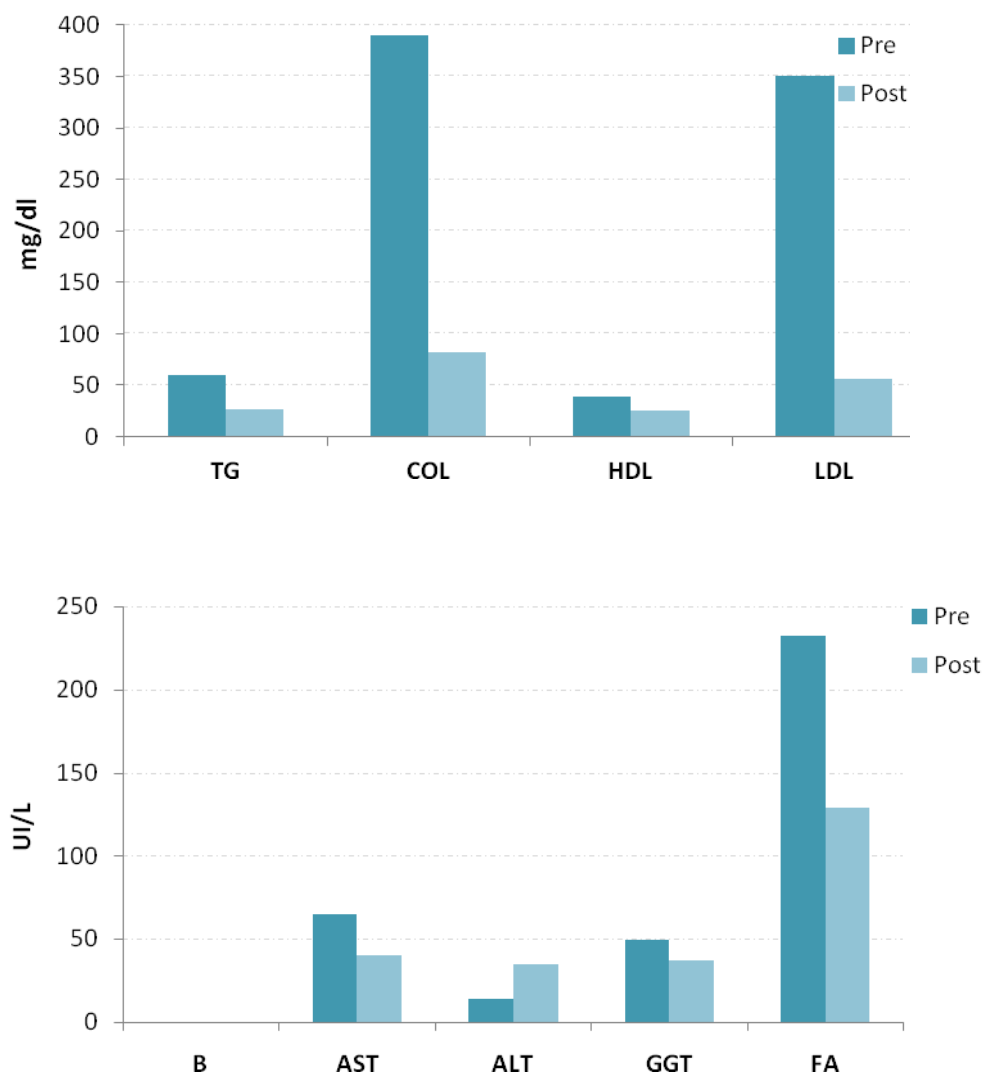


Fig.89. Valores medios de los parámetros pre-post para el Grupo 4.

TG= triglicéridos, COL= colesterol total, HDL= colesterol HDL, LDL= colesterol LDL, B= bilirrubina, AST=aspartato aminotransferasa, ALT= alanino aminotransferasa, GGT= gamma glutamil transferasa, FA= fosfatasa alcalina.

En el grupo 4 (grupo que discontinuó la dieta esteatósica y no se trató con melatonina) los valores medios de TG, Colesterol total, HDL, LDL, AST, ALT, GGT y FA también disminuyeron al final del periodo de estudio, presentando diferencias significativas entre los dos tiempos de estudio (pre y post).

7.5.2. ANÁLISIS DE LOS DIFERENTES PARÁMETROS SEROLÓGICOS

Los valores para las diferentes variables serológicas se aportan a continuación en las siguientes tablas (Tabla 4, Tabla 6, Tabla 8, Tabla 10, Tabla 12, Tabla 14, Tabla 16, Tabla 18, Tabla 20). Se han evaluado las diferencias de cada una de las variables (TG, COL, HDL, LDL, B, AST, ALT, GGT y FA) dentro de cada grupo en los dos tiempos de estudio (pre y post) y el porcentaje de cambio:

También se han evaluado en las siguientes tablas las diferencias de cada una de las variables serológicas entre los grupos en los dos tiempos de estudio. Se evalúan las diferencias comparando los grupos dos a dos para individualizar el efecto de la melatonina y el efecto de la dieta.

- Grupos 1-2.
 - La comparación de estos grupos pretende individualizar el efecto de la melatonina (grupo 1 tratado con melatonina, grupo 2 no tratado con melatonina), en dos grupos de animales que han continuado con la dieta.
- Grupos 3-4.
 - La comparación de estos grupos pretende individualizar el efecto de la melatonina (grupo 3 tratado con melatonina, grupo 4 no tratado con melatonina), en dos grupos de animales que no han continuado con la dieta.
- Grupos 1-3.
 - La comparación de estos grupos pretende individualizar el efecto de la dieta (grupo 1 ha continuado dieta esteatósica, grupo 3 no ha continuado dieta esteatósica), en dos grupos de animales que se han tratado con melatonina.
- Grupos 2-4.
 - La comparación de estos grupos pretende individualizar el efecto de la dieta (grupo 2 ha continuado dieta esteatósica, grupo 4 no ha continuado dieta esteatósica), en dos grupos de animales que no se han tratado con melatonina.

7.5.1.1. Triglicéridos

Tabla 4. TG por grupo de estudio.

Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	56,00 (53,45)			
	37,50 (47,00)			
1	27,33 (9,65)	28,00 (11,17)	0,906	20,32 (85,31)
	26,50 (17,00)	25,50 (10,00)		2,83 (50,36)
2	30,22 (10,03)	28,67 (13,59)	0,779	-3,46 (37,50)
	26,00 (20,00)	25,00 (22,00)		0,00 (67,49)
3	30,20 (14,55)	23,00 (5,05)	0,279	-10,13 (37,99)
	28,00 (27,00)	20,00 (9,00)		-10,71 (57,03)
4	59,20 (38,87)	26,00 (7,18)	0,043	-46,56 (20,97)
	39,00 (59,00)	25,00 (14,00)		-40,98 (32,83)
p valor				
Global ^b	0,146	0,785		0,048
1-2 ^c	0,619	0,915		0,546
3-4 ^c	0,116	0,528		0,076
1-3 ^c	0,792	0,267		0,461
2-4 ^c	0,094	0,947		0,028

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$*\% \text{ Cambio TG} = \frac{\text{TG Post} - \text{TG Pre}}{\text{TG Pre}} \times 100$$

El valor medio de TG aumenta en el grupo 1, sin ser este aumento estadísticamente significativo. En los grupos 2, 3 y 4 el nivel medio de TG desciende, siendo este descenso estadísticamente significativo solamente en el grupo 4 (animales que no continuaron con la dieta y que no fueron tratados con melatonina).

Al comparar por grupos dos a dos se observa que el porcentaje de cambio difiere de manera estadísticamente significativa sólo entre los grupos 2-4. Ambos grupos de animales no han tomado melatonina, el grupo 2 continuó con la dieta esteatósica y el grupo 4 suspendió la dieta esteatósica, por lo tanto la discontinuación de la dieta, en los pacientes que no toman melatonina, sí tiene un efecto significativo en la variación de los TG.

El modelo de regresión lineal confirma que no existe efecto de la dieta ni del tratamiento con melatonina de forma independiente sobre el porcentaje de cambio de los triglicéridos, tal y como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Triglicéridos.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-42,31	21,67	0,061	-86,70	2,09
Dieta	36,48	22,91	0,123	-10,45	83,41
Melatonina	27,92	21,52	0,205	-16,16	72,01

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de TG según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.90).

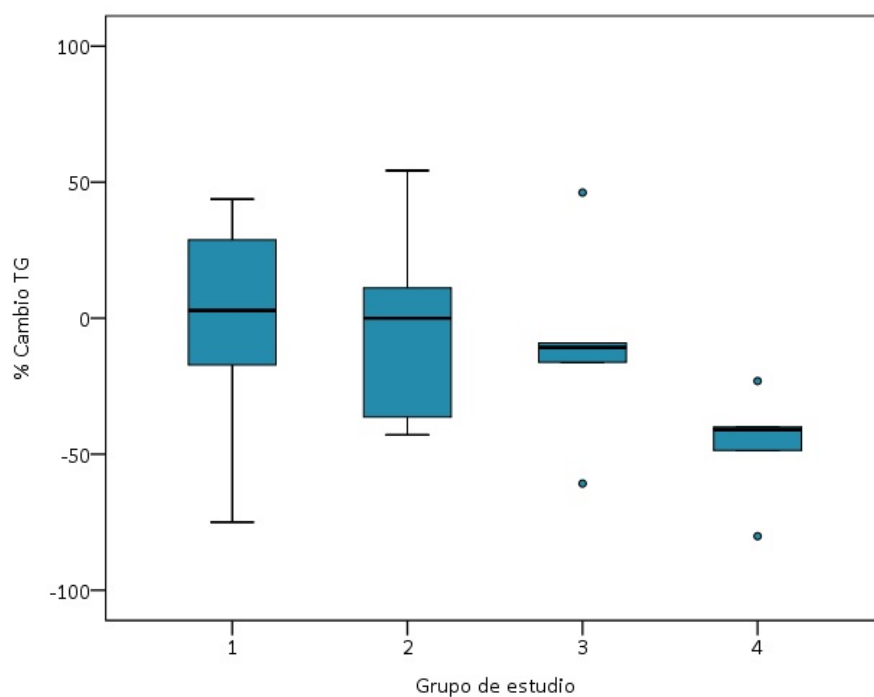


Fig.90. Diagrama de cajas para la variable Triglicéridos.

7.5.1.2. Colesterol total

Tabla 6. Colesterol Total por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	76,17 (16,14)			
	74,50 (33,00)			
1	252,58 (172,96)	225,83 (116,82)	0,347	1,75 (33,17)
	206,50 (209,00)	206,00 (108,00)		-6,15 (58,22)
2	186,67 (87,84)	158,78 (86,36)	0,767	11,24 (43,34)
	222,00 (176,00)	171,00 (163,00)		14,57 (55,64)
3	341,40 (156,68)	77,60 (8,02)	0,043	-73,54 (10,80)
	284,00 (305,00)	76,00 (15,00)		-74,65 (20,78)
4	389,60 (121,34)	82,40 (10,33)	0,043	-77,77 (4,42)
	338,00 (230,00)	85,00 (18,00)		-75,54 (8,39)
p valor				
Global ^b	0,043	0,001		<0,001
1-2 ^c	0,670	0,477		0,394
3-4 ^c	0,465	0,465		0,465
1-3 ^c	0,171	0,002		0,002
2-4 ^c	0,006	0,014		0,003

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$*\% \text{ Cambio Colesterol Total} = \frac{\text{Colesterol Total Post} - \text{Colesterol Total Pre}}{\text{Colesterol Total Pre}} \times 100$$

El valor medio de Colesterol Total ha disminuido en los grupos 3 y 4 (animales que discontinuaron la dieta, tratados con melatonina y no tratados con melatonina respectivamente) de manera significativa.

Al comparar por grupos dos a dos se observa que el porcentaje de cambio difiere de manera estadísticamente significativa entre los grupos 1-3 (animales que tomaron melatonina, el grupo 1 continuó la dieta esteatósica y el grupo 2 no) y entre los grupos 2-4 (animales que no han tomado melatonina, el grupo 2 continuó con la dieta esteatósica y el grupo 4 no). A la vista de los datos, podemos concluir que la dieta tiene un efecto sobre la variación del colesterol, independientemente de la toma o no de melatonina. El colesterol aumenta de media en los cerdos que continúan con la dieta y disminuye en los que la suspenden. El tratamiento con melatonina no tiene efecto significativo en la variación media de colesterol.

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la dieta y no del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio del colesterol total, tal y como se muestra en la Tabla 7. Podemos decir que de forma significativa los pacientes con dieta aumentan en 81,83 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio del colesterol.

Tabla 7. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Colesterol Total.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-73,16	11,52	0,000	-96,75	-49,56
Dieta	81,83	12,18	0,000	56,89	106,77
Melatonina	-5,00	11,44	0,665	-28,43	18,43

$$\% \text{Cambio Colesterol Total} = -73,16 + 81,83 \times \text{Dieta} - 5,00 \times \text{Melatonina}$$

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de Colesterol Total según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.91).

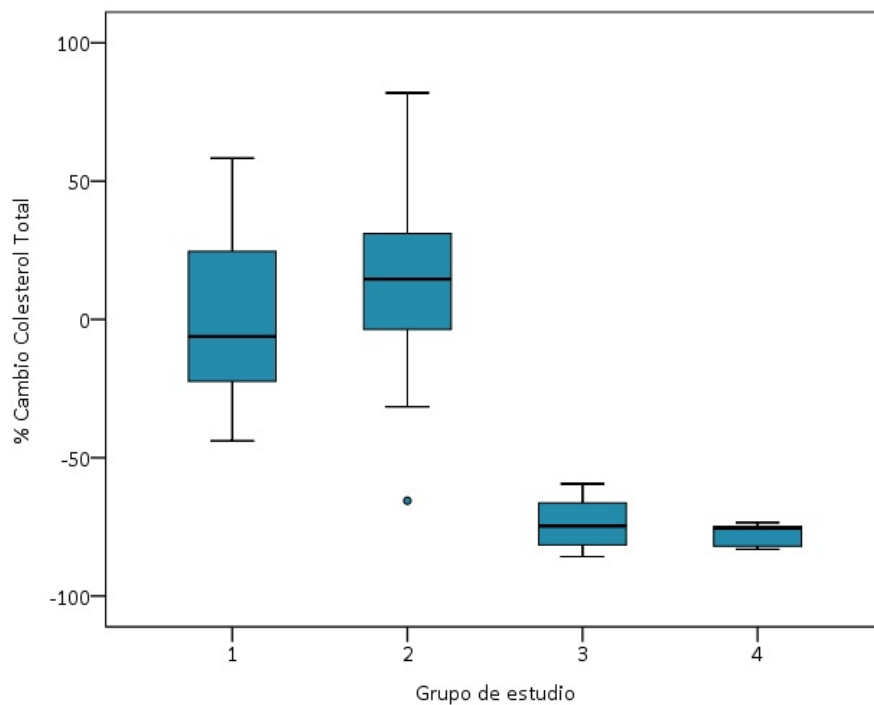


Fig.91. Diagrama de cajas para la variable Colesterol Total.

7.5.1.3. HDL

Tabla 8. HDL por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	28,67 (9,29)			
	27,50 (14,00)			
1	66,00 (24,83)	73,08 (17,95)	0,255	23,28 (45,37)
	57,00 (48,00)	69,00 (29,00)		13,09 (79,50)
2	65,89 (35,18)	49,78 (14,11)	0,213	-8,15 (41,66)
	46,00 (68,00)	43,00 (26,00)		-8,11 (79,69)
3	47,40 (8,56)	24,80 (6,26)	0,043	-47,95 (7,08)
	49,00 (17,00)	23,00 (12,00)		-47,27 (14,13)
4	39,00 (12,73)	25,80 (7,05)	0,043	-30,14 (20,56)
	39,00 (24,00)	23,00 (12,00)		-29,63 (36,89)
p valor				
Global ^b	0,174	<0,001		0,011
1-2 ^c	0,569	0,012		0,126
3-4 ^c	0,401	0,916		0,117
1-3 ^c	0,139	0,002		0,008
2-4 ^c	0,142	0,005		0,386

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$*\% \text{ Cambio HDL} = \frac{\text{HDL Post} - \text{HDL Pre}}{\text{HDL Pre}} \times 100$$

El valor medio de colesterol HDL aumenta en el grupo 1 de manera no significativa. En los grupos 2, 3 y 4 el nivel medio de colesterol HDL desciende, siendo esta diferencia estadísticamente significativa solamente en los grupos 3 y 4.

Al comparar por grupos dos a dos se observa que el porcentaje de cambio difiere de manera estadísticamente significativa sólo entre los grupos 1-3. Ambos grupos han tomado melatonina, el grupo 1 continuó la dieta esteatósica y el grupo 3 no continuó la dieta. Por lo tanto, la diferencia entre ellos, que es la continuación o no de la dieta, tiene un efecto significativo sobre la variación de los niveles de HDL pre-post.

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la dieta y no del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio del colesterol total, tal y como se muestra en la Tabla 9. Podemos decir que de forma significativa los pacientes con dieta aumentan en 47,76 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio del HDL.

Tabla 9. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio HDL.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-46,71	14,19	0,003	-75,78	-17,63
Dieta	47,76	15,00	0,004	17,03	78,49
Melatonina	15,32	14,09	0,286	-13,54	44,19

$$\% \text{Cambio HDL} = -46,71 + 47,76 \times \text{Dieta} + 15,32 \times \text{Melatonina}$$

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de HDL según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.92).

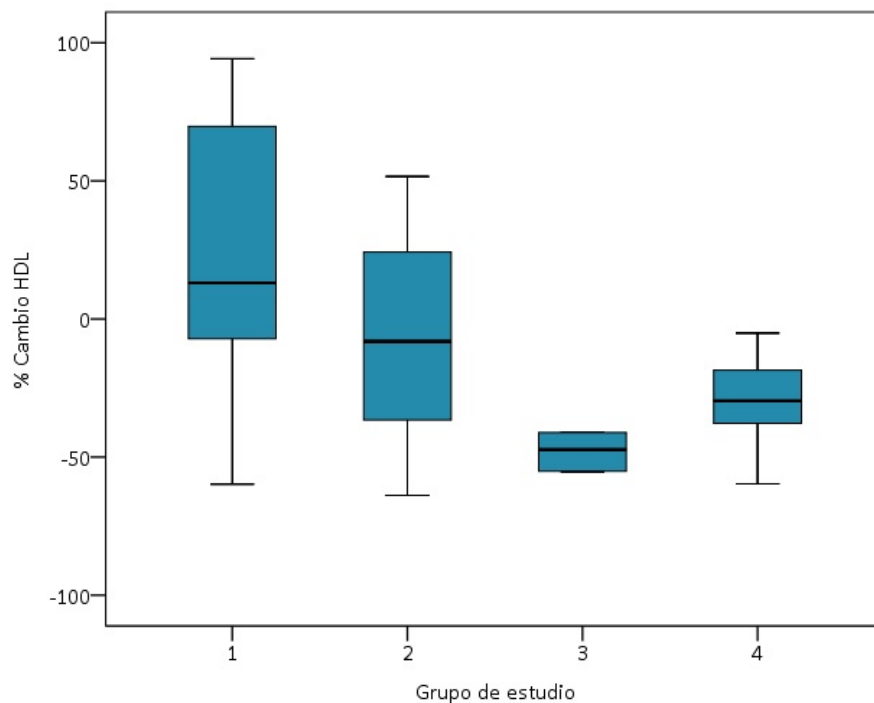


Fig 92. Diagrama de cajas para la variable HDL.

7.5.1.4. LDL

Tabla 10. LDL por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	47,50 (10,97)			
	49,50 (21,00)			
1	186,58 (159,44)	152,75 (110,70)	0,136	11,71 (75,26)
	153,50 (186,00)	109,00 (116,00)		-15,38 (70,05)
2	120,78 (76,32)	136,00 (78,67)	0,173	35,04 (60,11)
	129,00 (132,00)	128,00 (152,00)		40,91 (85,68)
3	294,00 (148,58)	52,80 (9,36)	0,043	-77,67 (12,00)
	235,00 (288,00)	50,00 (18,00)		-78,67 (22,15)
4	350,60 (125,03)	56,60 (10,01)	0,043	-82,62 (4,73)
	293,00 (239,00)	56,00 (17,00)		-80,55 (8,67)
p valor				
Global ^b	0,019	0,005		<0,001
1-2 ^c	0,394	0,943		0,155
3-4 ^c	0,347	0,602		0,602
1-3 ^c	0,171	0,004		0,002
2-4 ^c	0,004	0,028		0,003

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$*\% \text{ Cambio LDL} = \frac{\text{LDL Post} - \text{LDL Pre}}{\text{LDL Pre}} \times 100$$

El valor medio de colesterol LDL disminuye en los grupos 3 y 4, siendo este descenso estadísticamente significativo. En los grupos 1 y 2 el valor medio de LDL aumenta de manera no significativa.

Al comparar por grupos dos a dos se observa que el porcentaje de cambio difiere de manera estadísticamente significativa entre los grupos 1-3 y 2-4. Ambos grupos han tomado melatonina, el grupo 1 continuó la dieta esteatósica y el grupo 3 no continuó la dieta. El porcentaje de cambio también es estadísticamente significativo entre los grupos 2-4. Ambos grupos de animales no han tomado melatonina, el grupo 2 continuó con la dieta esteatósica y el grupo 4 suspendió la dieta esteatósica. Podríamos concluir por tanto que la continuación o no de la dieta esteatósica genera un efecto sobre la variación media de LDL.

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la dieta y no del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio del LDL, tal y como se muestra en la Tabla 11. Podemos decir que de forma significativa los pacientes con dieta aumentan en 102,85 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio del LDL.

Tabla 11. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio LDL.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-73,10	21,02	0,002	-116,16	-30,05
Dieta	102,85	22,22	0,000	57,34	148,37
Melatonina	-14,08	20,87	0,505	-56,83	28,67

$$\% \text{Cambio LDL} = -73,10 + 102,85 \times \text{Dieta} - 14,08 \times \text{Melatonina}$$

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de LDL según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.93).

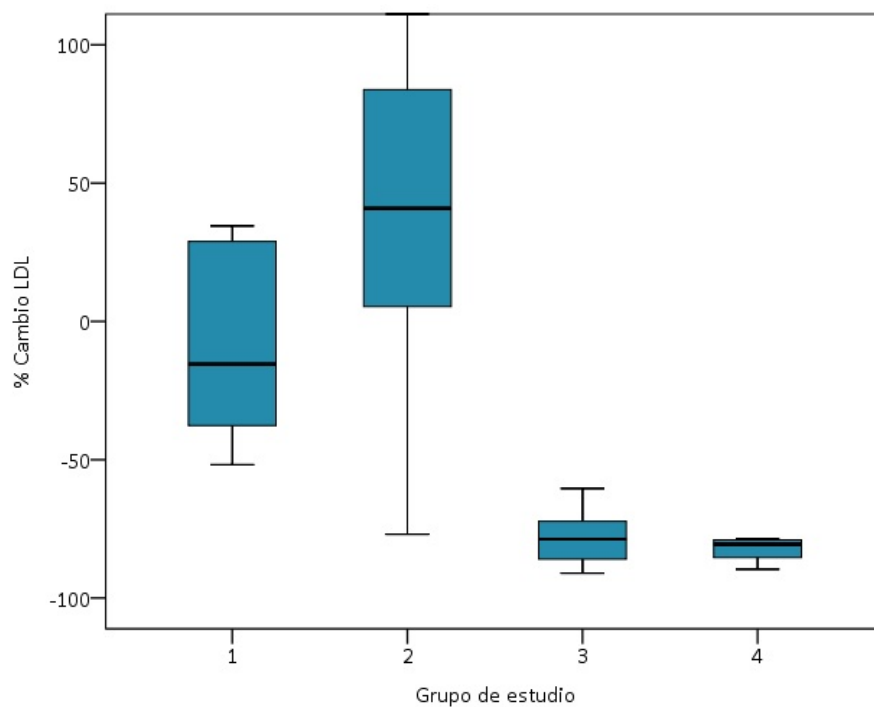


Fig.93. Diagrama de cajas para la variable LDL.

7.5.1.5. Bilirrubina

Tabla 12. B por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	0,22 (0,17)			
	0,18 (0,18)			
1	0,34 (0,23)	0,26 (0,15)	0,061	-18,66 (38,89)
	0,25 (0,27)	0,28 (0,30)		-20,00 (48,82)
2	0,73 (0,83)	0,22 (0,26)	0,017	-48,99 (43,80)
	0,53 (0,86)	0,11 (0,19)		-60,38 (71,20)
3	0,24 (0,15)	0,16 (0,16)	0,416	-11,57 (87,36)
	0,19 (0,28)	0,09 (0,21)		-45,45 (146,87)
4	0,20 (0,11)	0,18 (0,12)	0,588	-9,25 (55,59)
	0,20 (0,22)	0,14 (0,21)		-31,25 (95,83)
p valor				
Global ^b	0,293	0,430		0,287
1-2 ^c	0,255	0,193		0,082
3-4 ^c	0,753	0,463		0,754
1-3 ^c	0,341	0,279		0,721
2-4 ^c	0,125	0,640		0,109

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$*\% \text{ Cambio } B = \frac{B \text{ Post} - B \text{ Pre}}{B \text{ Pre}} \times 100$$

Se observa una disminución media de B en todos los grupos de estudio, pero la diferencia pre-post es únicamente significativa en el grupo 2 (animales que continuaron la dieta esteatósica y a los que no se administró melatonina).

En relación al porcentaje de cambio al comparar los grupos dos a dos, no existen diferencias significativas entre ellos, por lo que concluimos que ni la dieta ni la melatonina generan un efecto en la variación de B entre los dos tiempos.

El modelo de regresión lineal confirma que no existe efecto significativo de la dieta ni del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio de la Bilirrubina, tal y como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Bilirrubina.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-20,24	19,06	0,298	-59,28	18,81
Dieta	-22,65	20,15	0,271	-63,93	18,63
Melatonina	19,65	18,93	0,308	-19,12	58,42

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de B según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.94).

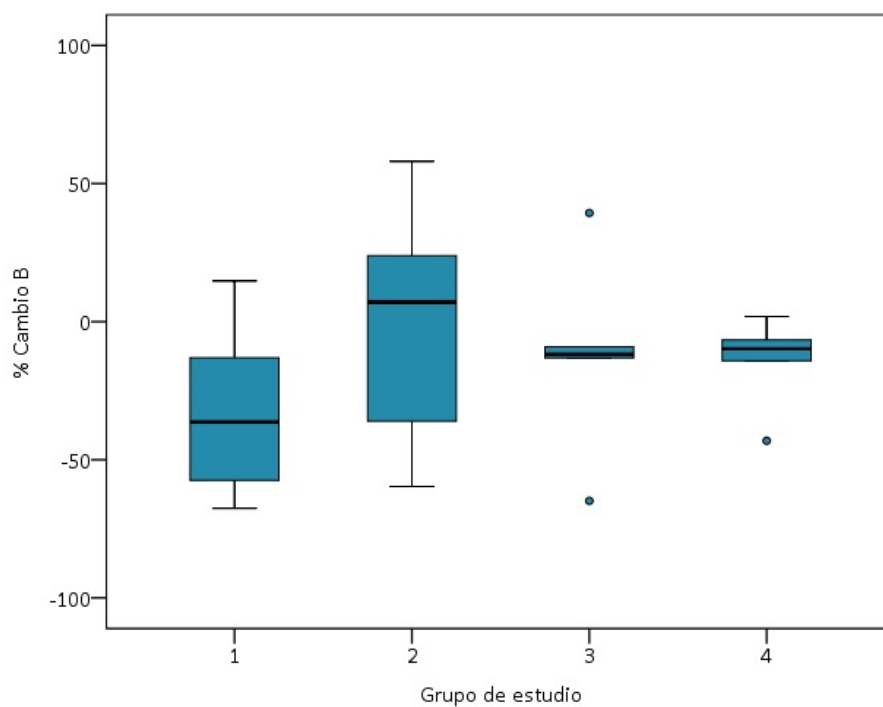


Fig.94. Diagrama de cajas para la variable B.

7.5.1.6. AST

Tabla 14. AST por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	-			
	-			
1	58,33 (31,99)	41,67 (19,08)	0,158	-14,54 (45,00)
	47,00 (52,00)	36,50 (34,00)		-8,45 (67,35)
2	75,11 (47,29)	32,67 (13,93)	0,008	-44,37 (24,85)
	75,00 (70,00)	30,00 (22,00)		-42,22 (42,59)
3	33,00 (5,00)	55,80 (38,46)	0,500	76,52 (141,10)
	33,00 (8,00)	37,00 (73,00)		8,83 (239,45)
4	65,00 (10,56)	39,80 (5,40)	0,043	-37,11 (15,82)
	66,00 (19,00)	42,00 (10,00)		-44,78 (29,27)
p valor				
Global ^b	0,067	0,492		0,063
1-2 ^c	0,434	0,285		0,177
3-4 ^c	0,009	0,834		0,047
1-3 ^c	0,091	0,633		0,171
2-4 ^c	0,947	0,141		0,947

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$*\% \text{ Cambio AST} = \frac{\text{AST Post} - \text{AST Pre}}{\text{AST Pre}} \times 100$$

No tenemos datos del parámetro AST para grupo control, debido a una interferencia del resultado por coagulación de las muestras.

El valor medio AST disminuye en los grupos 1, 2 y 4, siendo significativo en los grupos 2 y 4. En el grupo 3 el nivel medio AST aumenta de manera no significativa (animales que discontinuaron la dieta y se trataron con melatonina).

Al comparar los grupos dos a dos se observa que el porcentaje de cambio difiere de manera estadísticamente significativa sólo entre los grupos 3-4. Ambos grupos han discontinuado la dieta esteatósica, el grupo 3 tomó melatonina y el grupo 4 no tomó melatonina. Se concluye que la melatonina tiene un efecto sobre el cambio porcentual pre-post de AST en los animales que no continúan la dieta esteatósica.

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la melatonina y no de la dieta sobre el porcentaje de cambio de la Bilirrubina, tal y como se muestra en la Tabla 15. Podemos decir que de forma significativa los pacientes con melatonina aumentan en 57,25 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio de la bilirrubina.

Tabla 15. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio AST.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-9,82	23,82	0,711	-57,70	39,87
Dieta	-51,12	25,18	0,052	-102,68	0,45
Melatonina	57,25	23,65	0,022	8,81	105,69

$$\% \text{Cambio AST} = -9,82 - 51,12 \times \text{Dieta} + 57,25 \times \text{Melatonina}$$

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de AST según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.95).

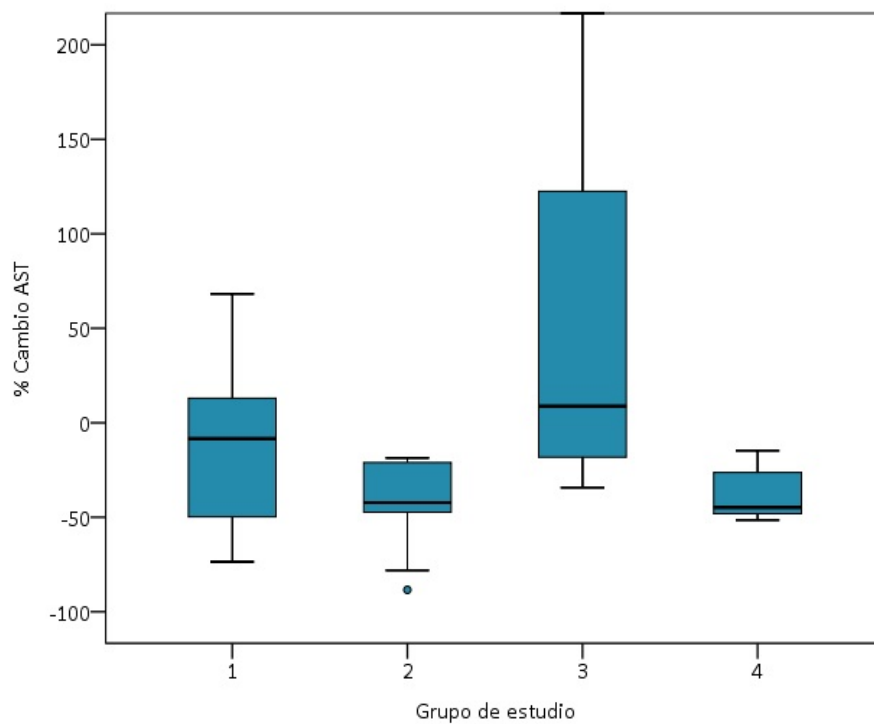


Fig.95. Diagrama de cajas para la variable AST.

7.5.1.7. ALT

Tabla 16. ALT por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	-	-		
1	17,75 (3,31)	17,42 (5,47)	0,754	-2,57 (21,69)
	18,50 (4,00)	17,00 (7,00)		-7,67 (29,01)
2	16,00 (5,39)	11,44 (3,88)	0,123	-20,34 (35,51)
	14,00 (9,00)	11,00 (6,00)		-18,18 (64,92)
3	14,00 (3,08)	34,00 (13,84)	0,043	133,28 (64,16)
	14,00 (5,00)	41,00 (24,00)		162,50 (111,48)
4	14,00 (2,35)	34,40 (5,32)	0,042	146,99 (25,52)
	13,00 (4,00)	34,00 (9,00)		138,89 (36,49)
p valor				
Global ^b	0,185	<0,001		<0,001
1-2 ^c	0,336	0,012		0,256
3-4 ^c	0,596	0,917		0,917
1-3 ^c	0,063	0,030		0,002
2-4 ^c	0,737	0,003		0,003

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$*\% \text{ Cambio ALT} = \frac{\text{ALT Post} - \text{ALT Pre}}{\text{ALT Pre}} \times 100$$

No tenemos datos del parámetro ALT para grupo control, debido a una interferencia del resultado por coagulación de las muestras.

El valor medio de ALT disminuye en los grupos 1 y 2 (cerdos que continuaron la dieta esteatósica) de manera no significativa y aumenta en los grupos 3 y 4 de manera significativa (cerdos que discontinuaron la dieta esteatósica).

Comparando los grupos dos a dos existen diferencias significativas entre los grupos 1-3 y 2-4. El grupo 1 continuó la dieta esteatósica y el grupo 3 no continuó la dieta. El grupo 2 continuó con la dieta esteatósica y el grupo 4 suspendió la dieta esteatósica. por lo tanto el tipo de dieta supone una diferencia en cuanto a la variación media de ALT, independientemente de que los animales se hayan tratado o no con melatonina.

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la dieta y no del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio de ALT, tal y como se muestra en la Tabla 17. Podemos decir que de forma significativa los pacientes con dieta disminuyen en 150,86 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio del ALT.

Tabla 17. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio ALT.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	136,40	13,06	0,000	109,64	163,16
Dieta	-150,86	13,81	0,000	-179,15	-122,57
Melatonina	7,47	12,87	0,569	-19,10	34,04

$$\% \text{Cambio ALT} = 136,40 - 150,86x\text{Dieta} + 7,47x\text{Melatonina}$$

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de ALT según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.96).

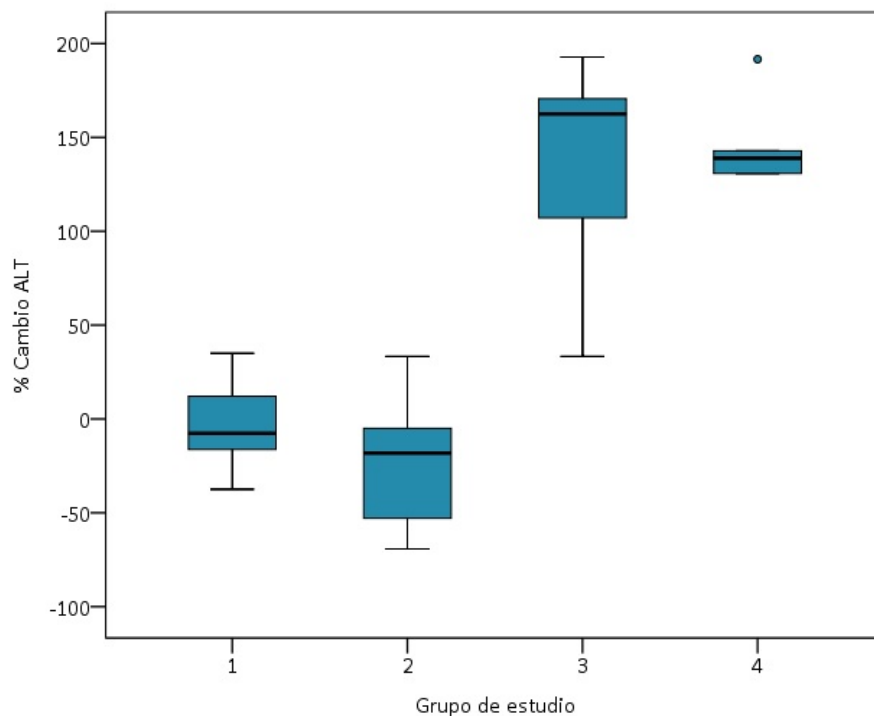


Fig.96. Diagrama de cajas para la variable ALT.

7.5.1.8. GGT

Tabla 18. GGT por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	35,00 (12,99)			
	34,50 (25,00)			
1	56,58 (14,11)	53,42 (12,18)	0,541	-3,40 (21,60)
	54,50 (15,00)	53,00 (14,00)		-3,32 (27,39)
2	52,44 (16,28)	49,89 (19,21)	0,674	0,38 (38,83)
	53,00 (22,00)	51,00 (23,00)		-1,89 (42,93)
3	55,20 (18,39)	43,80 (17,70)	0,043	-19,72 (16,55)
	63,00 (35,00)	34,00 (29,00)		-14,29 (28,86)
4	49,40 (19,63)	36,80 (15,25)	0,043	-25,57 (16,99)
	43,00 (35,00)	36,00 (23,00)		-25,64 (32,32)
p valor				
Global ^b	0,914	0,213		0,158
1-2 ^c	0,749	0,393		0,972
3-4 ^c	0,754	0,916		0,602
1-3 ^c	0,874	0,225		0,114
2-4 ^c	0,640	0,285		0,125

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$*\% \text{ Cambio GGT} = \frac{\text{GGT Post} - \text{GGT Pre}}{\text{GGT Pre}} \times 100$$

El valor medio de GGT disminuye en todos los grupos, siendo esta disminución significativa estadísticamente en los grupos 3-4 (grupos que discontinuaron la dieta).

Al comparar los grupos dos a dos observamos que no existen diferencias significativas en el porcentaje de cambio medio pre-post de GGT, por lo tanto asumimos que ni la dieta ni la melatonina generan un efecto en los niveles de GGT.

El modelo de regresión lineal confirma que no existe efecto significativo ni la dieta ni del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio de GGT, tal y como se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio GGT.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-22,33	9,64	0,028	-42,07	-2,59
Dieta	20,91	10,19	0,050	0,04	41,78
Melatonina	-0,64	9,57	0,947	-20,24	18,97

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de GGT según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.97).

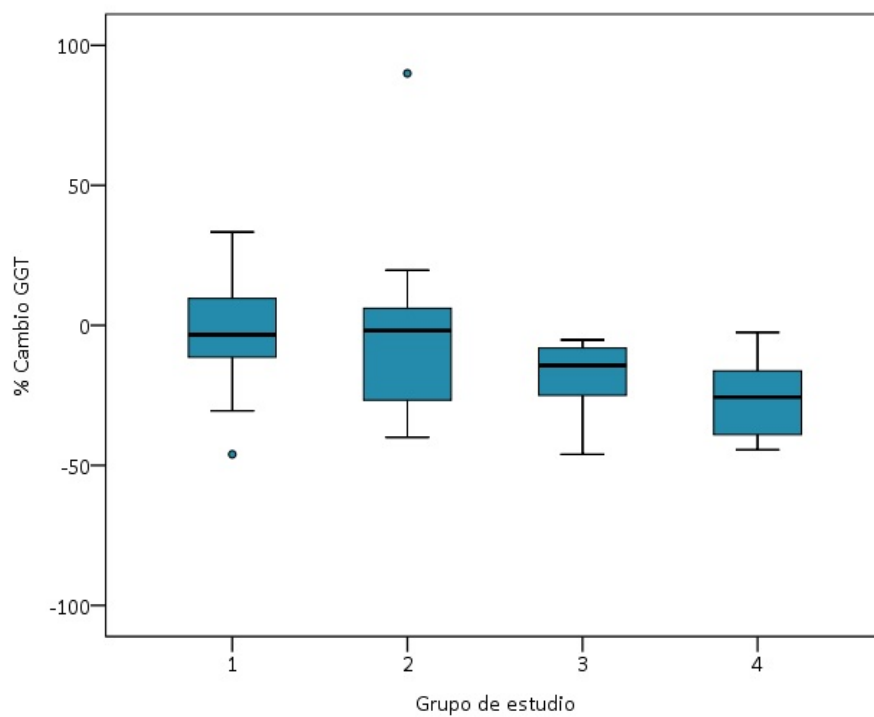


Fig.97. Diagrama de cajas para la variable GGT.

7.5.1.9. Fosfatasa alcalina

Tabla 20. FA por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio
Control	106,33 (42,97)			
1	200,25 (86,79)	162,08 (73,51)	0,050	-14,07 (46,16)
	193,00 (128,00)	161,00 (79,00)		-25,54 (28,30)
2	212,78 (83,46)	232,56 (201,04)	0,767	53,65 (176,33)
	207,00 (93,00)	184,00 (144,00)		-29,95 (172,26)
3	193,60 (75,98)	103,00 (65,50)	0,225	-35,37 (46,90)
	168,00 (113,00)	102,00 (118,00)		-39,29 (91,43)
4	232,00 (29,63)	128,60 (28,74)	0,043	-43,81 (14,98)
	227,00 (51,00)	136,00 (45,00)		-47,74 (27,86)
p valor				
Global ^b	0,475	0,211		0,467
1-2 ^c	0,570	0,570		1,000
3-4 ^c	0,117	0,251		0,917
1-3 ^c	0,916	0,206		0,527
2-4 ^c	0,549	0,142		0,386

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$*\% \text{ Cambio FA} = \frac{\text{FA Post} - \text{FA Pre}}{\text{FA Pre}} \times 100$$

El valor medio de FA disminuye en los grupos 1, 3 y 4, aunque este descenso sólo es significativo en el grupo 4. Sin embargo, en el grupo 2 se produce un aumento de media no significativo.

Al comparar los grupos dos a dos observamos que no existen diferencias en cuanto a porcentaje de cambio. Concluimos que ni la dieta ni el tratamiento influyen en el porcentaje de cambio de FA.

El modelo de regresión lineal confirma que no existe efecto significativo ni la dieta ni del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio de FA, tal y como se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio FA.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-18,19	37,18	0,629	-94,34	57,97
Dieta	57,60	39,30	0,154	-22,90	138,10
Melatonina	-42,81	36,91	0,256	-118,43	32,81

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de FA según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.98).

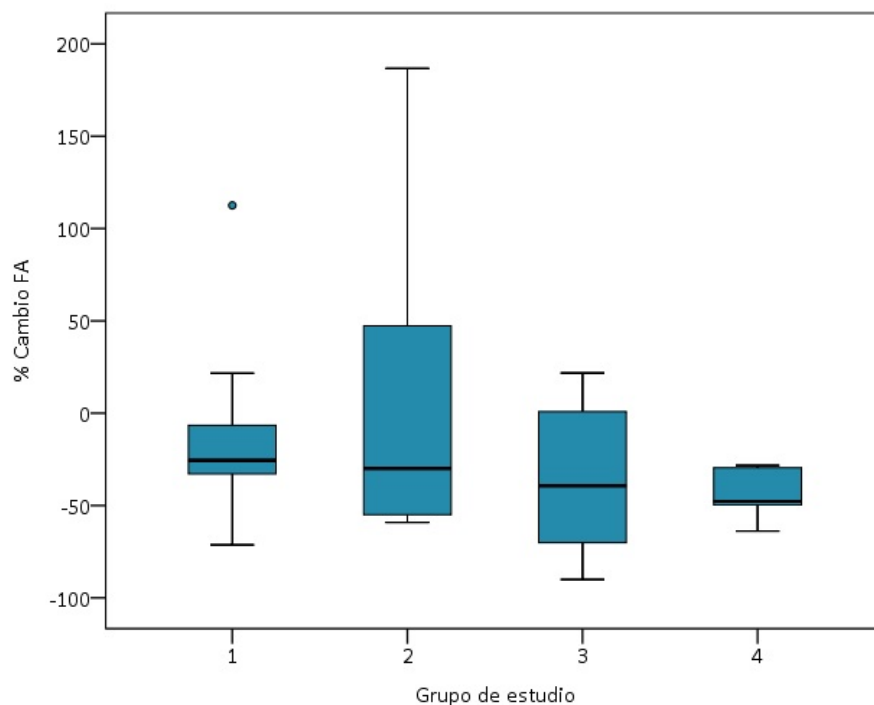


Fig.98. Diagrama de cajas para la variable FA.

7.6. ANATOMÍA PATOLÓGICA

En la histología hepática tenemos en cuenta para el estudio cuatro variables:

- Grado o porcentaje de esteatosis.
 - Medido por patólogo mediante visión directa.
 - Medido por programa de análisis digital de imagen.
- Distribución de la esteatosis.
 - Centrolobulillar.
 - Periférica.
 - Difusa.
- Morfología de la esteatosis.
 - Macrovesicular.
 - Microvesicular.
- Grado de fibrosis.

La variable de grado de esteatosis fue medida mediante visión directa al microscopio óptico por un patólogo experimentado y mediante un programa informático de análisis digital de la imagen desarrollado por el propio equipo de investigación.

En la primera biopsia, la morfología de la esteatosis ha sido macrovesicular en todos los animales (100%). La distribución de la esteatosis ha sido mayoritariamente centrolobulillar (Fig. 99), presente en 19 animales (61,29%), periférica (Fig.100) en 9 animales (29,03%) y difusa en 3 animales (9,68%). Se observó fibrosis leve en las muestras de 14 animales (45,16%).

En la segunda biopsia, la morfología de la esteatosis también ha sido preferentemente macrovesicular, ya que presentaba esta morfología de esteatosis el 100% de las muestras. 15 (48,38%) animales presentaban una distribución centrolobulillar de la esteatosis, 8 (3,22%) animales distribución difusa y los 8 (3,22%) restantes distribución periférica.

El grado de esteatosis presente en los cerdos del grupo control ha sido nula (0%), por lo que no consideramos la valoración del resto de características histológicas.

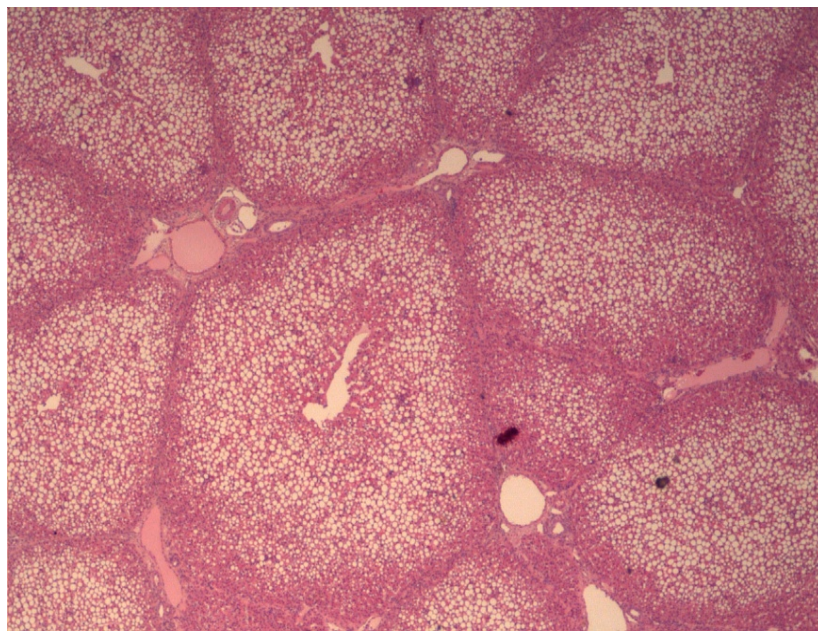


Fig 99. Distribución de la esteatosis centrolobulillar, respetando las zonas periféricas del lobulillo hepático (HE 2x).

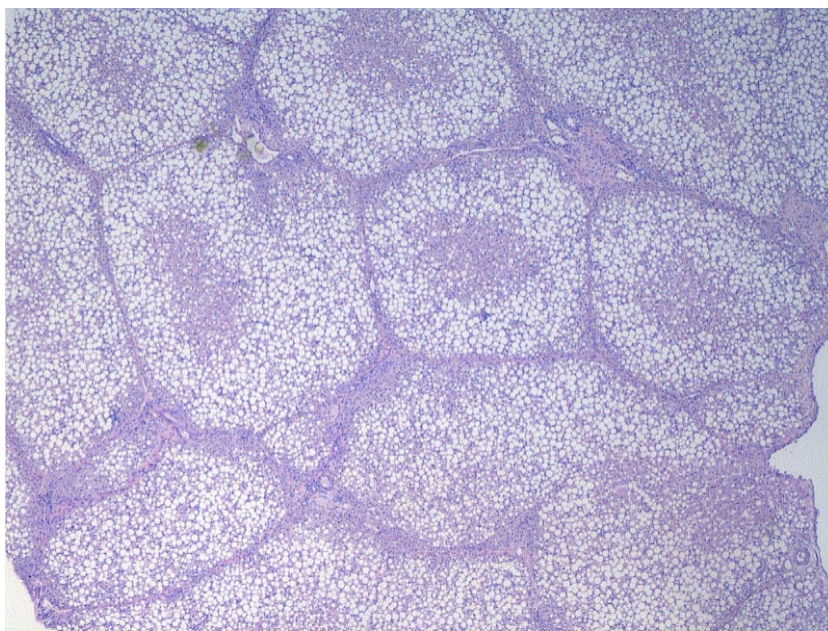


Fig.100. Distribución de la esteatosis periférica, respetando las zonas centrolobulillare (HE 2x).

7.6.1. GRADO DE ESTEATOSIS ANALIZADO POR VISIÓN DIRECTA DEL PATÓLOGO

En la Fig.101 se observa de forma gráfica el grado de esteatosis medio por grupos en los dos tiempos de estudio analizado por visión directa del patólogo.

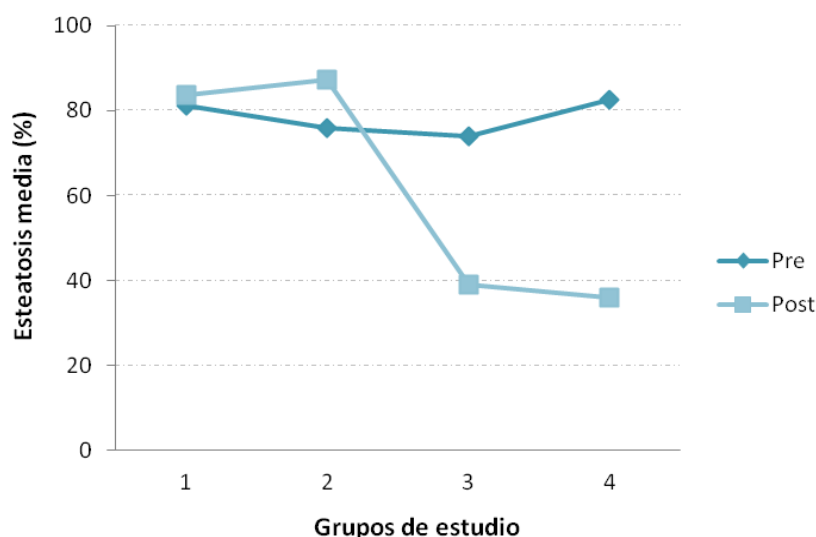


Fig.101. Esteatosis media pre-post por grupos de estudio.

Se observa una disminución de la esteatosis en los grupos 3 y 4, y un aumento de la esteatosis en los grupos 1 y 2.

En la siguiente tabla (Tabla 22), como en las anteriores variables, se han evaluado las diferencias en la variable grado de esteatosis dentro de cada grupo en los dos tiempos (pre y post), así como la diferencia y el porcentaje de cambio.

También se evalúan en la siguiente tabla las diferencias de la variable grado de esteatosis entre los grupos en los dos tiempos de estudio. Se evalúan las diferencias comparando los grupos dos a dos para individualizar el efecto de la melatonina y el efecto de la dieta.

Se observa que en el inicio no existían diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos, lo que indica que todos los grupos partían de niveles similares de esteatosis.

Tabla 22. Esteatosis analizada por patólogo por grupos. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre- Post)	Diferencia (*)	%Cambio (**)
1	81,25 (7,80)	83,75 (9,80)	0,511	2,50 (10,39)	3,62 (13,05)
	80,00 (13,75)	90,00 (10,00)		6,25 (10,00)	7,67 (12,50)
2	75,83 (20,92)	87,22 (9,39)	0,079	11,39 (17,55)	23,41 (36,61)
	85,00 (38,75)	85,00 (17,50)		5,00 (28,75)	5,56 (48,02)
3	74,00 (14,75)	39,00 (21,33)	0,066	-35,00 (21,51)	-47,68 (28,82)
	80,00 (25,00)	30,00 (37,50)		-35,00 (35,00)	-62,50 (46,76)
4	82,50 (9,01)	36,00 (11,40)	0,042	-46,50 (16,91)	-55,48 (16,05)
	80,00 (16,25)	40,00 (20,00)		-50,00 (31,25)	-56,76 (29,96)
p valor					
Global ^b	0,825	<0,001		<0,001	<0,001
1-2 ^c	0,858	0,659		0,390	0,412
3-4 ^c	0,395	1,000		0,673	1,000
1-3 ^c	0,420	0,002		0,005	0,005
2-4 ^c	0,947	0,003		0,003	0,003

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

*Diferencia Esteatosis Patólogo = Esteatosis Patólogo Post – Esteatosis Patólogo Pre

**% Cambio Esteatosis Patólogo = $\frac{\text{Esteatosis Patólogo Post} - \text{Esteatosis Patólogo Pre}}{\text{Esteatosis Patólogo Pre}} \times 100$

Al comparar el porcentaje de esteatosis medio en cada uno de los grupos se observa un aumento de la esteatosis en los grupos 1 y 2 (los grupos que continuaron con la dieta esteatósica) sin ser las diferencias estadísticamente significativas, y una disminución en los grupos 3 y 4 (los grupos que discontinuaron la dieta esteatósica), con diferencias estadísticamente significativas entre los dos tiempos para el grupo 4 ($p=0,042$). Así pues los cerdos que continúan la dieta esteatósica aumentan la esteatosis y los cerdos que discontinúan la dieta disminuyen la esteatosis.

La comparación en cuanto al porcentaje de cambio entre los grupos 1-2 para evaluar el efecto de la melatonina sobre los cerdos que continúan con la dieta, y entre los grupos 3-4 para evaluar el efecto de la melatonina sobre los cerdos sin dieta esteatósica, comparaciones principales del estudio, no resultan estadísticamente significativas.

Sí que existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de cambio medio entre los grupos 1-3 y los grupos 2-4, por lo que asumimos que la dieta tiene un efecto sobre el cambio pre-post de la esteatosis, independientemente de la ingesta o no de melatonina. Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 1-2, se puede observar que los cerdos que consumen melatonina y continúan con la dieta (grupo 1) no aumentan tanto la esteatosis como los cerdos que continúan con la dieta y no toman melatonina (grupo 2), aunque $p>0.05$.

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la dieta y no del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio de la Esteatosis, tal y como se muestra en la Tabla 23. Podemos decir que de forma significativa los pacientes con dieta aumentan en 64,45 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio de la esteatosis.

Tabla 23. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Esteatosis Patólogo.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-46,20	9,30	0,000	-65,24	-27,16
Dieta	64,45	9,83	0,000	44,32	84,57
Melatonina	-10,76	9,23	0,253	-29,67	8,14

$$\% \text{Cambio Esteatosis Patólogo} = -46,20 + 64,45 \times \text{Dieta} - 10,76 \times \text{Melatonina}$$

En la siguiente figura (Fig.102) también se representan los datos del porcentaje de cambio ya aportados en la tabla 23.

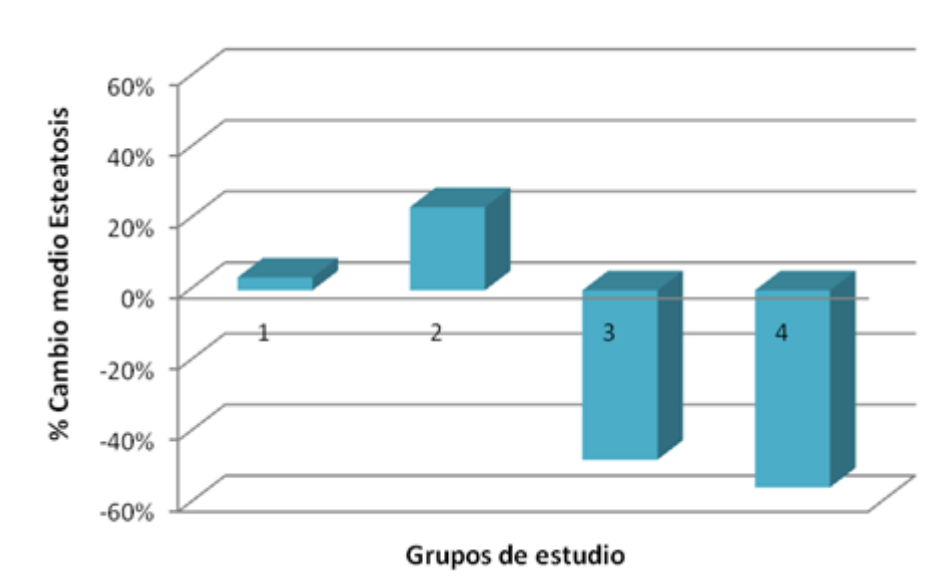


Fig 102. Porcentaje de cambio medio de esteatosis por grupos.

Se estudia la relación entre el nivel de esteatosis al inicio y el porcentaje de cambio. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Spearman. En la Tabla 24 se observa el coeficiente de correlación y la significación estadística para el total del grupo y para cada grupo individualmente.

Tabla 24. Coeficiente de correlación Esteatosis Patólogo Pre vs %Cambio.

GRUPO	Coeficiente de Correlación	p valor
Total	-0,385	0,032
1	-0,684	0,014
2	-0,879	0,002
3	0,205	0,741
4	-0,462	0,434

Se puede observar que, al diferenciar por grupos, en los grupos 3 y 4 la relación no es significativa pero sí para los grupos 1 y 2, por lo que se puede concluir que en los animales que continúan la dieta el nivel inicial de esteatosis sí que influye en el cambio pre-post de esteatosis.

En la Fig.103 y Fig.104 se representa gráficamente la relación entre el nivel de esteatosis al inicio y el porcentaje de cambio para los grupos que adquieren significación estadística (grupo 1 y 2).

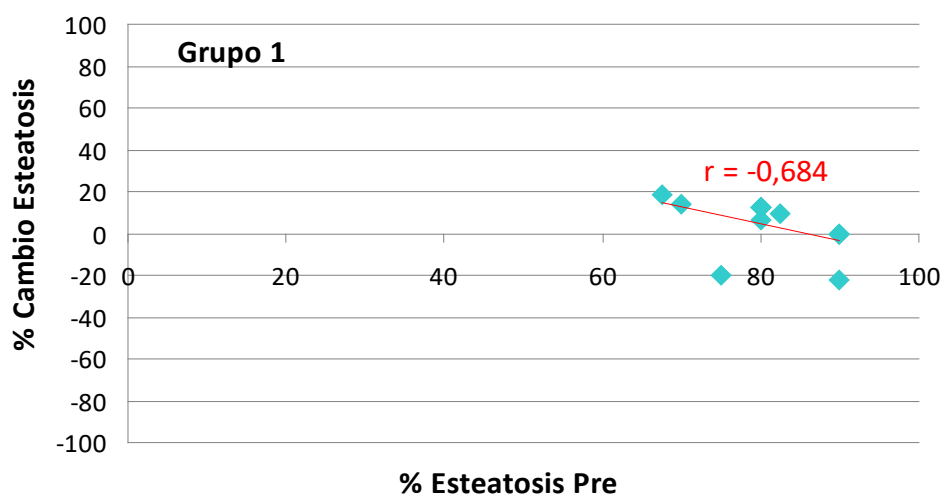


Fig.103. Diagrama de dispersión esteatosis pre vista por patólogo – % cambio, en el grupo 1.

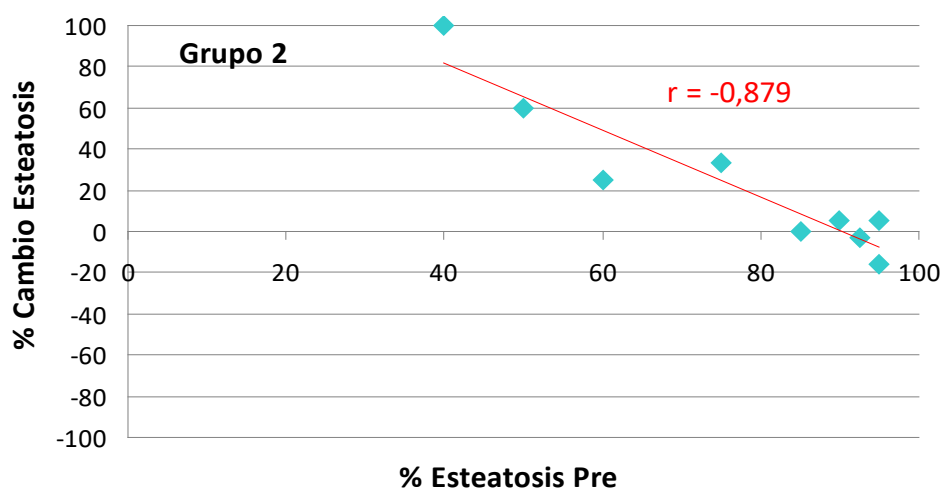


Fig.104. Diagrama de dispersión esteatosis pre vista por patólogo - % cambio, en el grupo 2.

La relación entre el nivel de esteatosis al inicio y el porcentaje de cambio para los grupos 1 y 2 es estadísticamente significativa con coeficientes de correlación de -0,684 ($p=0,014$) y -0,879 ($p=0,002$), respectivamente. Relación negativa fuerte en ambos grupos, por lo tanto, a mayor esteatosis al inicio, menor es el porcentaje de cambio.

7.6.2. GRADO DE ESTEATOSIS ANALIZADO CON EL PROGRAMA DE TRATAMIENTO DE IMÁGENES

En la Fig.105 se observa de forma gráfica el grado de esteatosis medio por grupos en los dos tiempos de estudio analizado digitalmente por el programa informático de tratamiento de imágenes.

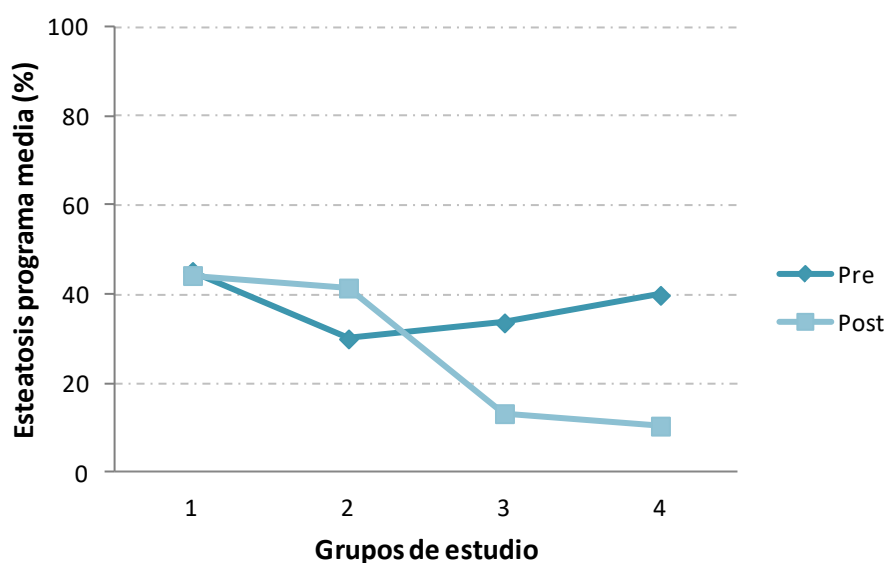


Fig.105. Porcentaje de esteatosis (programa) media pre-post por grupos de estudio

Se observa una disminución de la esteatosis en los grupos 1, 3 y 4, y un aumento de la esteatosis en el grupo 2.

En la siguiente tabla (Tabla 25), como en las anteriores variables, se han evaluado las diferencias en la variable grado de esteatosis dentro de cada grupo en los dos tiempos (pre y post), así como la diferencia y el porcentaje de cambio.

También se evalúan en la siguiente tabla las diferencias de la variable grado de esteatosis entre los grupos en los dos tiempos de estudio. Se evalúan las diferencias comparando los grupos dos a dos para individualizar el efecto de la melatonina y el efecto de la dieta.

Tabla 25. Esteatosis analizada por programa por grupos. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en el primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre- Post)	Diferencia (*)	%Cambio (**)
1	45,17 (11,44)	44,25 (10,01)	0,423	-0,91 (9,74)	2,49 (33,69)
	47,50 (19,75)	46,50 (14,50)		-2,50 (11,25)	-5,69 (23,23)
2	30,00 (10,42)	41,44 (9,46)	0,008	11,44 (9,74)	50,97 (64,24)
	29,00 (16,50)	40,00 (12,50)		8,00 (10,00)	26,92 (44,19)
3	33,60 (10,21)	13,20 (6,14)	0,043	-20,40 (12,60)	-56,52 (9,72)
	40,00 (19,00)	11,00 (11,50)		-20,00 (25,00)	-48,78 (44,29)
4	39,80 (8,48)	10,40 (4,72)	0,043	-29,40 (6,31)	-74,32 (9,73)
	35,00 (15,40)	12,00 (9,00)		-29,40 (10,20)	-48,78 (44,29)
p valor					
Global ^b	0,037	<0,001		<0,001	<0,001
1-2 ^c	0,010	0,434		0,004	0,002
3-4 ^c	0,465	0,530		0,347	0,251
1-3 ^c	0,073	0,002		0,010	0,003
2-4 ^c	0,095	0,003		0,003	0,003

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

*Diferencia Esteatosis Programa = Esteatosis Programa Post – Esteatosis Programa Pre

**% Cambio Esteatosis Programa = $\frac{\text{Esteatosis Programa Post} - \text{Esteatosis Programa Pre}}{\text{Esteatosis Programa Pre}} \times 100$

Al comparar el porcentaje de esteatosis medio en cada uno de los grupos se observa una disminución en los grupos 3 y 4 (animales que discontinúan la dieta esteatósica, el grupo 3 se trata con melatonina y el grupo 4 no), con diferencias estadísticamente significativas entre los dos tiempos ($p=0,043$ y $p=0,043$ respectivamente), efecto esperado al discontinuar la dieta esteatósica. Respecto a los grupos 1 y 2 (animales que continúan con la dieta esteatósica) se observa que el grupo 2 (animales que continúan con la dieta y no toman melatonina), el porcentaje de esteatosis aumenta siendo este aumento significativo ($p=0,08$), a diferencia de lo que ocurre en el grupo 1 (animales que continúan con la dieta y toman melatonina), en el que el grado de esteatosis no aumenta, se mantiene en unos valores muy similares.

Destacar que la comparación en cuanto al porcentaje de cambio entre los grupos 1-2 para evaluar el efecto de la melatonina sobre los cerdos que continúan con la dieta es estadísticamente significativa ($p=0,002$), lo que significa que de los cerdos que continúan con la dieta, los que consumen melatonina no aumentan de media la esteatosis tanto como los que no la consumen. También existen diferencias significativas en cuanto al porcentaje de cambio medio entre los grupos 1-3 y los grupos 2-4, por lo que asumimos entonces que la dieta tiene un efecto sobre el cambio pre-post de la esteatosis, independientemente de la toma o no de melatonina.

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la dieta y no del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio de la Esteatosis, tal y como se muestra en la Tabla 26. Podemos decir que de forma significativa los pacientes con dieta aumentan en 90,60 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio de la esteatosis del programa.

Tabla 26. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Esteatosis Programa.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-52,01	16,23	0,000	-85,27	-18,76
Dieta	90,60	17,16	0,000	55,45	125,75
Melatonina	-26,81	16,12	0,107	-59,82	6,21

$$\% \text{Cambio Esteatosis Programa} = -52,01 + 90,60 \times \text{Dieta} - 26,81 \times \text{Melatonina}$$

La siguiente figura (Fig.106) representa los datos del porcentaje de cambio ya aportados en la tabla 26.

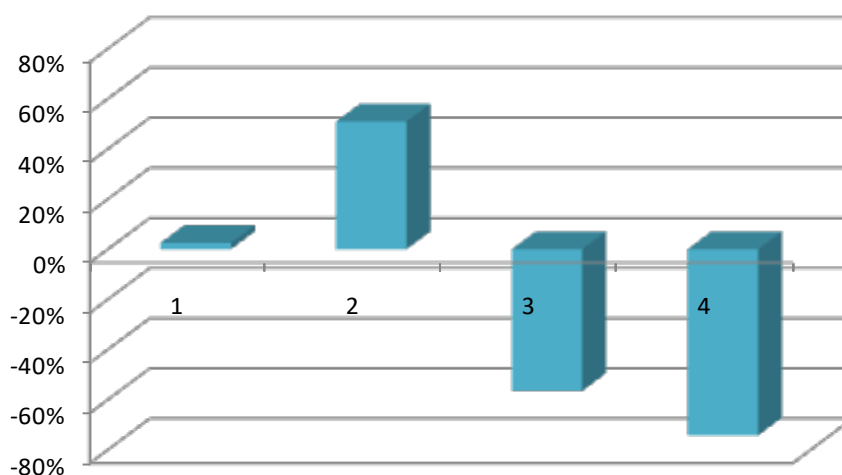


Fig.106. Porcentaje de cambio medio de esteatosis del programa por grupos.

Se estudia la relación entre el grado de esteatosis al inicio y el porcentaje de cambio. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Spearman. En la tabla 27 se observa el coeficiente de correlación y la significación estadística para el total del grupo y para cada grupo individualmente.

Tabla 27. Coeficiente de correlación Esteatosis Programa Pre vs % cambio.

GRUPO	Coeficiente de Correlación	p valor
Total	-0,345	0,057
1	-0,245	0,443
2	-0,904	0,001
3	-0,600	0,285
4	0,100	0,873

En esta tabla se puede observar que al diferenciar por grupos, la relación sólo es estadísticamente significativa para el grupo 2.

En la Fig.107 se representa gráficamente la relación entre el nivel de esteatosis al inicio y el porcentaje de cambio para el grupo 2, con significación estadística.

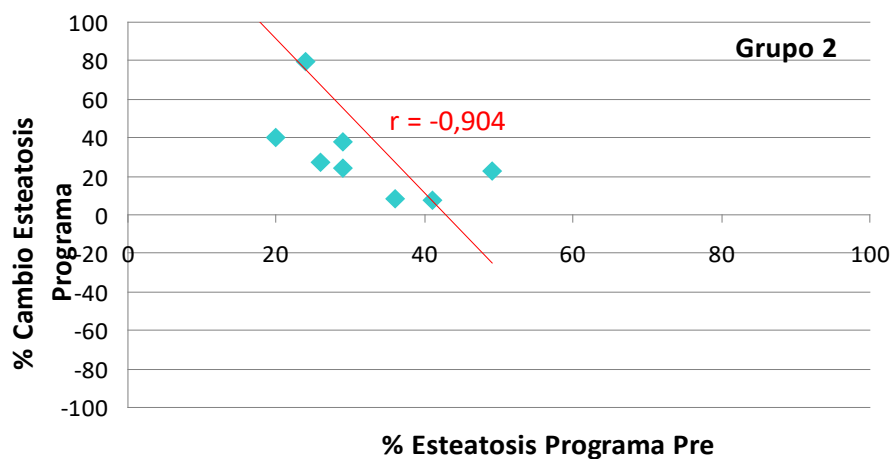


Fig.107. Diagrama de dispersión esteatosis pre programa – % cambio post-pre, en el grupo

2

La relación entre el nivel de esteatosis al inicio y el porcentaje de cambio para el grupo 2 es estadísticamente significativa con coeficientes de correlación de -0,904 ($p=0,001$). Relación negativa fuerte en ambos grupos, por lo tanto, a mayor esteatosis al inicio, menor es el porcentaje de cambio.

7.6.3. GRADO DE ESTEATOSIS ANALIZADO BAJO VISIÓN DIRECTA DEL PATÓLOGO VS GRADO DE ESTEATOSIS ANALIZADO POR PROGRAMA DE TRATAMIENTO DE IMÁGENES

Se observa que la esteatosis del programa aporta en todos los casos unos valores medios inferiores a los obtenidos por visión directa del patólogo. De media la esteatosis por patólogo puntúa 40,68 % (DE=14,66) más en el momento pre y 36,87 % (DE=13,45) más en el momento post.

En la siguiente figura (Fig.108) se puede observar de manera gráfica los valores medios del grado de esteatosis de ambas mediciones por grupos para los dos tiempos estudiados (pre y post).

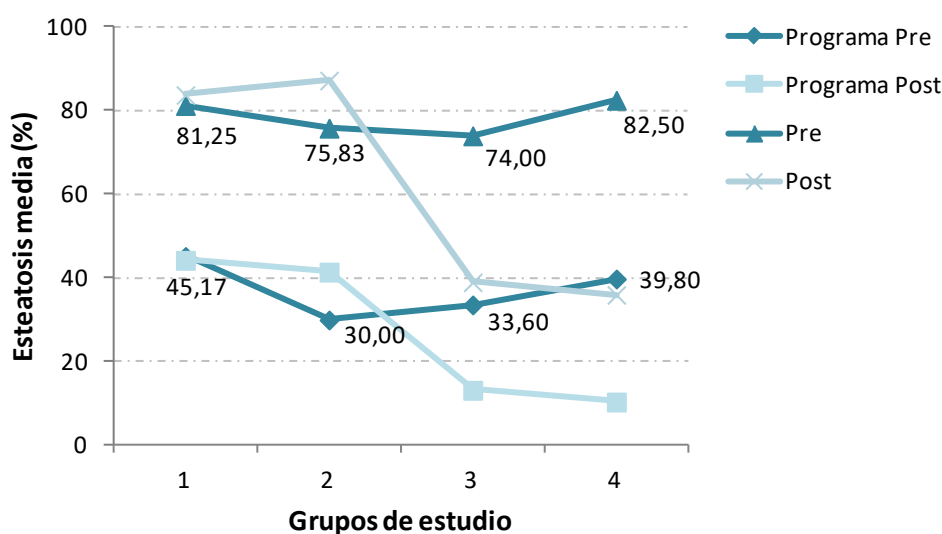


Fig.108. Porcentaje de esteatosis media pre-post por grupos de estudio.

Se observa la misma tendencia en los grupos de estudio tanto en valor pre como en valor post para cada forma de evaluación del grado de esteatosis (patólogo vs. programa).

En los siguientes gráficos se observa el grado de correlación entre la esteatosis

pre del programa y la esteatosis pre del patólogo (Fig.109) y entre la esteatosis post del programa y la esteatosis post del patólogo (Fig.110).

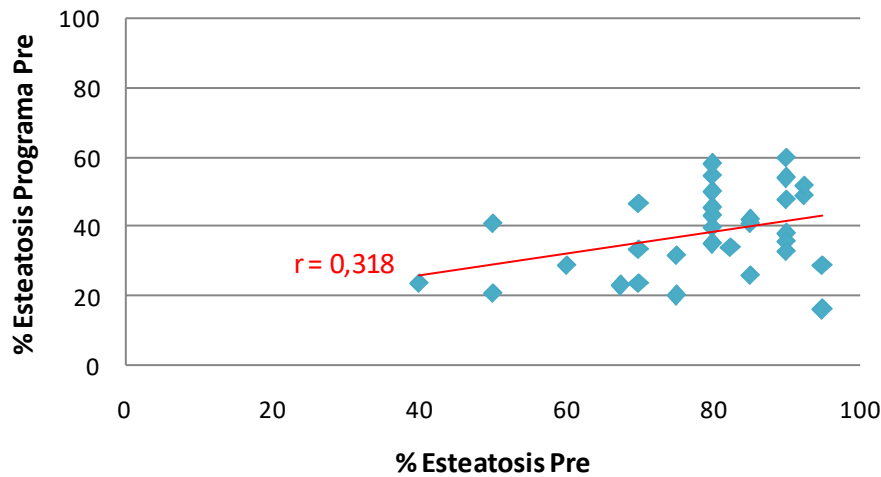


Fig.109. Diagrama de dispersión esteatosis programa pre – esteatosis patólogo pre.

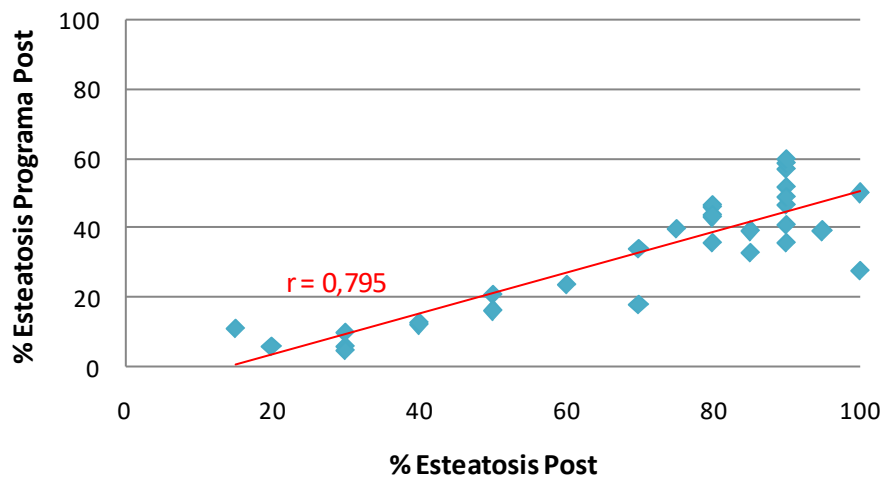


Fig.110. Diagrama de dispersión esteatosis programa post – esteatosis patólogo post.

El coeficiente de correlación de Spearman ($r=0,318$) indica una relación débil positiva entre la esteatosis pre vista por patólogo y la esteatosis pre del programa aunque esta relación no es estadísticamente significativa ($p=0,082$). La relación es estadísticamente significativa entre ambos métodos ($p<0,001$) para los valores post, obteniendo un coeficiente de correlación lineal de 0,795 lo que indica relación fuerte positiva entre ambas variables.

En la siguiente figura (Fig.111) se muestra la relación existente entre el porcentaje de cambio obtenido con el programa y el porcentaje de cambio obtenido con el patólogo.

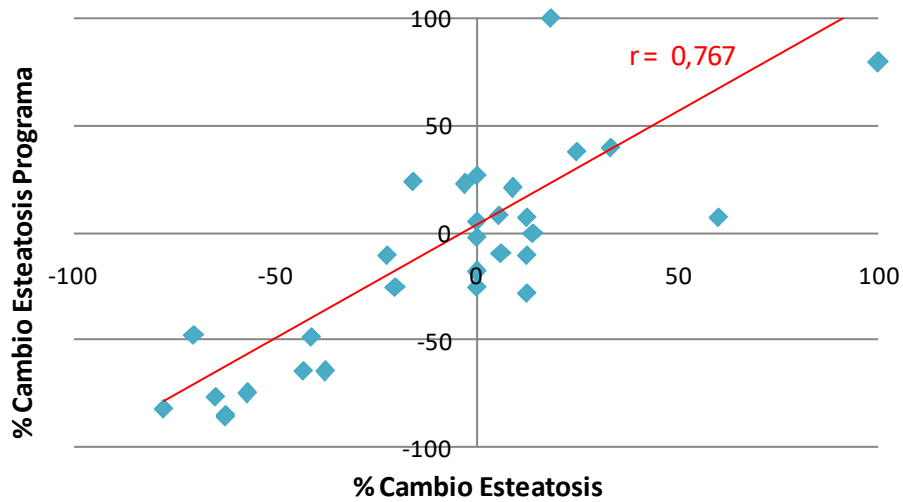


Fig.111. Diagrama de dispersión % cambio esteatosis programa – % cambio esteatosis patólogo.

El porcentaje de cambio de la esteatosis entre el tiempo pre y post del seguimiento de los cerdos, muestra una fuerte relación lineal entre ambos métodos, se obtiene un coeficiente de correlación de 0,767 con un nivel de significación inferior a 0,001.

7.7. MEDICIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO: MDA Y CARBONILOS

Malondialdehído es el producto final mayoritario del proceso de peroxidación lipídica en los procesos de estrés oxidativo.

Los carbonilos son productos procedentes de la degradación oxidativa de las proteínas.

Medimos las concentraciones de MDA y Carbonilos para valorar a nivel molecular el estado de estrés oxidativo al que se ha sometido al hígado así como el posible efecto antioxidante de la melatonina.

7.7.1. MALONDIALDEHIDO (MDA)

Tal y como se muestra en la Tabla 28, se han evaluado las diferencias en la variable MDA dentro de cada grupo en los dos tiempos de estudio, así como el porcentaje de cambio.

Se han evaluado las diferencias en la variable MDA existentes entre los grupos en los dos tiempos de estudio. Así pues se evalúan las diferencias de MDA comparando los grupos dos a dos. Interesa principalmente la comparación entre los grupos para individualizar el efecto de la melatonina y el efecto de la dieta.

Tabla 28. MDA por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	0,77 (0,48)			
	0,65 (0,52)			
1	2,13 (0,92)	1,27 (0,50)	0,004	-34,15 (26,16)
	2,13 (1,70)	1,23 (0,76)		-36,33 (45,75)
2	1,88 (0,83)	1,64 (0,57)	0,594	-0,40 (41,46)
	1,91 (1,30)	1,41 (0,71)		7,07 (73,40)
3	1,57 (0,66)	1,25 (0,46)	0,345	-11,94 (36,88)
	1,17 (1,22)	0,99 (0,87)		-11,85 (54,14)
4	1,18 (0,28)	0,97 (0,08)	0,080	-14,36 (17,11)
	1,06 (0,33)	0,95 (0,13)		-9,80 (26,26)
p valor				
Global ^b	0,122	0,110		0,177
1-2 ^c	0,374	0,145		0,055
3-4 ^c	0,249	0,834		0,917
1-3 ^c	0,187	1,000		0,206
2-4 ^c	0,124	0,004		0,463

^aTest de Wilcoxon. ^bTest de Kruskal-Wallis. ^cTest de U de Mann-Whitney.

$$**\% \text{ MDA} = \frac{\text{MDA Post} - \text{MDA Pre}}{\text{MDA Pre}} \times 100$$

En todos los grupos de estudio se produce un descenso del valor medio de MDA, siendo estadísticamente significativo en el grupo 1 (cerdos que continúan la dieta esteatósica y se les administra melatonina).

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos comparados en cuanto a porcentaje de cambio, lo cual indica que ni la dieta ni la melatonina influyen en la variación de MDA.

El modelo de regresión lineal confirma que no existe efecto significativo ni la dieta ni del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio de MDA, tal y como se muestra en la Tabla 29.

Tabla 29. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio MDA.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	-2,19	11,94	0,856	-26,65	22,27
Dieta	-4,97	12,62	0,697	-30,83	20,88
Melatonina	-21,92	11,86	0,075	-46,20	2,37

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de MDA según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.112).

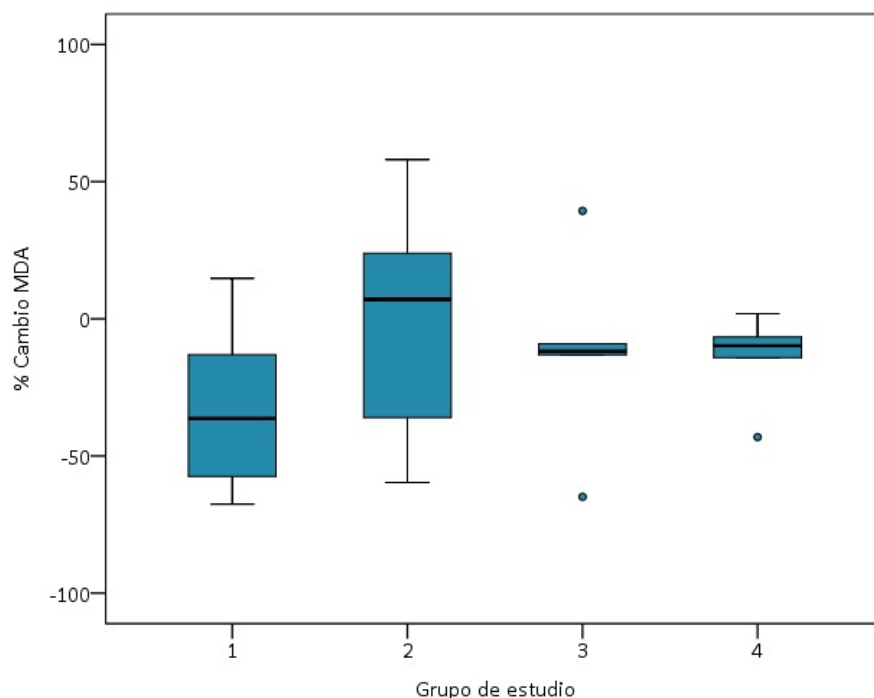


Fig.112. Diagrama de cajas para la variable MDA.

7.7.2. CARBONILOS

Tal y como se muestra en la Tabla 30, se han evaluado las diferencias en la variable Carbonilos dentro de cada grupo en los dos tiempos de estudio, así como el porcentaje de cambio.

Se han evaluado las diferencias en la variable Carbonilos existentes entre los grupos en los dos tiempos de estudio. Así pues se evalúan las diferencias de Carbonilos comparando los grupos dos a dos. Interesa principalmente la comparación entre los grupos para individualizar el efecto de la melatonina y el efecto de la dieta.

Tabla 30. Carbonilos por grupo de estudio. Se muestran datos de media con desviación estándar (DE) en la primera fila y mediana con rango intercuartílico (RIQ) en la segunda fila.

GRUPO	Pre	Post	p valor ^a (Pre-Post)	%Cambio (*)
Control	5,40 (0,70)			
	5,55 (1,37)			
1	8,64 (1,18)	7,22 (2,23)	0,070	-15,26 (26,46)
	8,54 (1,63)	7,45 (4,05)		-13,83 (33,58)
2	8,26 (1,25)	9,20 (1,09)	0,100	13,16 (20,00)
	8,02 (1,66)	9,56 (1,95)		6,47 (35,83)
3	4,89 (0,89)	5,30 (1,27)	0,437	9,46 (24,40)
	5,16 (1,64)	5,21 (2,29)		9,41 (47,08)
4	4,99 (1,17)	6,69 (0,45)	0,028	40,15 (34,73)
	5,42 (2,25)	6,69 (0,78)		21,03 (64,72)
p valor				
Global ^b	<0,001	0,001		0,003
1-2 ^c	0,488	0,016		0,014
3-4 ^c	0,876	0,049		0,145
1-3 ^c	<0,001	0,093		0,093
2-4 ^c	<0,001	<0,001		0,166

^aTest de T de Student para muestras relacionadas. ^bANOVA. ^cTest de T de Student para muestras independientes.

$$*\% \text{ Cambio Carbonilos} = \frac{\text{Carbonilos Post} - \text{Carbonilos Pre}}{\text{Carbonilos Pre}} \times 100$$

En los grupos 2, 3 y 4 se produce un descenso medio de carbonilos, siendo solamente significativo en el grupo 4. Tampoco tiene significación estadística el pequeño descenso medio que se produce en el grupo 1 (cerdos que continúan la dieta y son tratados con melatonina).

Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 1 y el grupo 2. El porcentaje de cambio al comparar el grupo 1 y 2 es estadísticamente significativo, lo cual significa que el tratamiento con melatonina tiene efecto en el cambio pre-post de los carbonilos en los pacientes que continúan con la dieta.

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo tanto de la dieta como del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio de Carbonilos, tal y como se muestra en la Tabla 31. Podemos decir que de forma significativa los pacientes con dieta disminuyen en 25,80 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio del Carbonilos, y los pacientes con melatonina lo disminuyen en 29,16 puntos porcentuales.

Tabla 31. Modelo de regresión lineal. Variable dependiente % cambio Carbonilos.

	Coeficientes no estandarizados		p valor	IC 95% β	
	β	EE		Inferior	Superior
Constante	39,38	9,27	0,000	20,40	58,36
Dieta	-25,80	9,79	0,014	-45,86	-5,74
Melatonina	-29,16	9,20	0,004	-48,01	-10,32

$$\% \text{Cambio Carbonilos} = 39,38 - 25,80 \times \text{Dieta} - 29,16 \times \text{Melatonina}$$

De manera gráfica, se representa el porcentaje de cambio de carbonilos según los grupos de estudio en el siguiente diagrama de cajas (Fig.113).

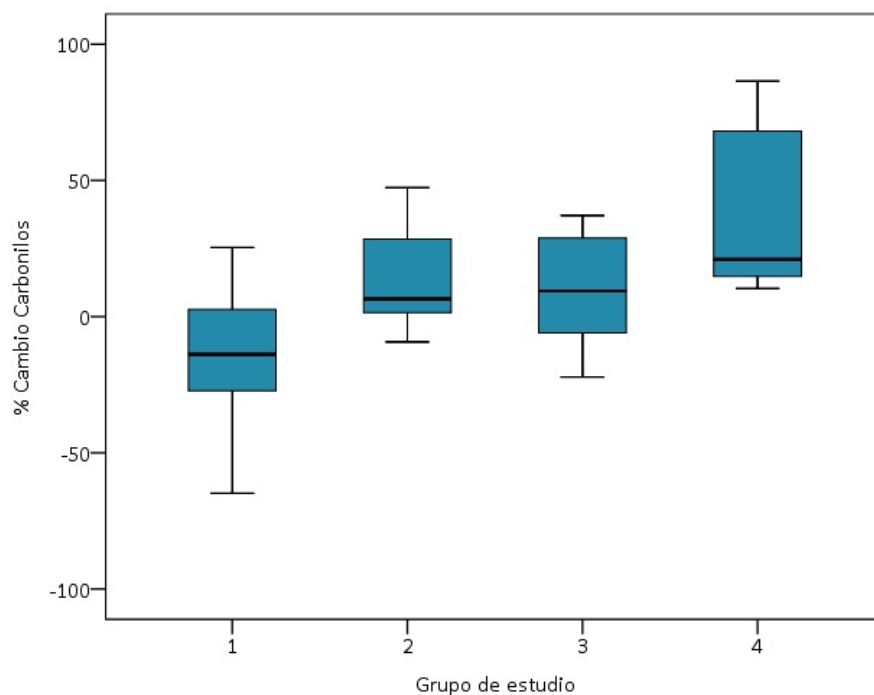


Fig.113. Diagrama de cajas para la variable Carbonilos.

8. DISCUSIÓN

La esteatosis hepática o NAFLD es uno de los procesos hepáticos mas prevalentes en la sociedad occidental. Aún siendo una enfermedad silente, que puede tardar en descubrirse hasta varios años, cuando la víscera hepática ya ha alcanzado un alto grado de infiltración, es una de las mayores causas de fracaso hepático en el mundo occidental. Habitualmente asociada, aunque no exclusivamente, a la obesidad y al síndrome metabólico, puede llegar a suponer una auténtica epidemia en el futuro.

El tratamiento de la misma se ha basado en una drástica modificación del género de vida y de las conductas alimentarias. Numerosos autores han comprobado que la reducción del sobrepeso, y de la consiguiente resistencia a la insulina, puede lograr restablecer la fisiología y la histología hepática³⁸. Aunque desconocemos el alcance de estas medidas y su verdadera eficacia.

Multitud de grupos de investigación y una gran cantidad de recursos se han dedicado a buscar una alternativa más rápida y “más llevadera” para los pacientes, basada en fármacos⁶⁶. No existe, hasta la fecha, un tratamiento médico realmente eficaz que prevenga o disminuya la esteatosis una vez establecida o que reduzca sus efectos patológicos¹¹².

Se han ensayado muchos fármacos, antioxidantes, hepatoprotectores, complejos vitamínicos, scavengers de radicales libres etc. con la idea de o bien evitar el acumulo de los lípidos en el hepatocito o de extraer los lípidos de las células³⁸.

Nobili publicó un estudio²²⁵ en el que a un grupo de jóvenes con NAFLD probada con biopsia se les trató con complejos vitamínicos antioxidantes (alfa tocoferol y ácido ascórbico) junto con un control estricto de la ingesta encontrando una disminución del grado de infiltración grasa del hígado y una mejora de los parámetros bioquímicos, concluyendo que bastaba una mejora del estilo de vida sin necesidad de fármaco alguno para lograr esta mejora.

La vitamina E y sus derivados (tocoferoles) son unos potentes antioxidantes que frenan la producción de radicales libres de oxígeno y modulan la actividad de señales enzimáticas, al menos in vitro y en cultivos celulares. Diversos estudios clínicos en humanos, han demostrado que el tratamiento con vitamina E parece ser una buena opción para mejorar la histología y la citolisis hepática en los pacientes con NAFLD¹²⁶. Sin embargo existen diversas limitaciones para el tratamiento con vitamina E, ya que no se recomienda para NASH en pacientes diabéticos, NAFLD sin biopsia o cirrosis establecida, de acuerdo con las guías americanas. Además se han planteado serias cuestiones con respecto a la inocuidad del tratamiento a largo plazo³⁸.

El ácido ursodesoxicólico también se ha ensayado por su buen documentado efecto citoprotector hepático, aunque en al menos dos ensayos clínicos publicados este fármaco no ha demostrado su eficacia frente al placebo^{142,143}. Los datos actuales no muestran ningún beneficio sustancial del ácido ursodesoxicólico en el tratamiento de la NASH, y las guías americanas no lo recomiendan como tratamiento de NAFLD³⁸.

Otros fármacos que se han ensayado como los fármacos antidiabéticos (metformina, pioglitazona, rosiglitazona), hipolipemiantes y antihipertensivos (inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina) no han demostrado su utilidad en ensayos clínicos o bien su seguridad^{38,126,132,139,145} y su eficacia todavía no están definidas para el tratamiento de NAFLD.

Se han ensayado otros tratamientos con sustancias como el ácido obeticólico, biciclolo etc.² demostrando efectos beneficiosos, aunque se necesitan más estudios para definir su utilidad en NAFLD.

En resumen, hasta la fecha no existe tratamiento farmacológico eficaz de la NAFLD, que no vaya unido a una modificación del estilo de vida, incluyendo una pérdida de peso. El descubrimiento de un medicamento con esas propiedades podría cambiar el espectro y la repercusión de la enfermedad.

8.1. LA MELATONINA COMO POTENTE ANTIOXIDANTE

La melatonina, hormona universal que se produce, en concentraciones diversas, en casi toda nuestra economía, ha sido estudiada como una de las posibles soluciones a la alteración del metabolismo lipídico y al acumulo de grasa hepatocitaria.

¿Porque la melatonina? El efecto de la melatonina sobre el metabolismo graso se puede resumir en una disminución de la peroxidación lipídica y disminución del estrés oxidativo, fenómenos bioquímicos íntimamente relacionados con el acúmulo de lípidos en el hepatocito. Aunque se han atribuido a la melatonina otros efectos como¹⁶⁸:

- Estimulación de enzimas antioxidantes ya presentes en los hepatocitos.
- Regulación de genes transcriptores de enzimas antioxidantes.
- Scavenger de radicales libres de oxígeno.
- Estimulación de la síntesis de glutatión.
- Aumento de la actividad de otras moléculas antioxidantes.
- Disminución de la generación de radicales libres en las mitocondrias.
- Disminución de la expresión de proteínas que tienen acción sobre la acumulación de lípidos en el citoplasma del hepatocito.
- Protección de las membranas celulares ante la peroxidación lipídica.
- Disminución de los factores proinflamatorios responsables de la progresión de NAFLD a NASH.

En multitud de estudios previos la melatonina presenta marcados efectos protectores sobre el daño hepático inducido por fármacos, sustancias lesivas (tetracloruro de carbono, nitrosaminas, lipopolisacáridos, metales pesados etc.)¹⁷⁸ e incluso para situaciones que alteran la fisiología hepática (isquemia-reperfusión, ligadura del conducto biliar principal, dietas con alto contenido en grasas etc.)²⁰⁴.

La melatonina tiene un efecto primordial en la peroxidación de los ácidos grasos y la peroxidación de los lípidos de la membranas¹⁷⁶ (tanto citoplásmicas como mitocondriales). La peroxidación lipídica es el paso fundamental para que la esteatosis se convierta en esteatohepatitis y de ahí a inflamación, necrosis y fibrosis (Fig. 114). Así pues, al menos en el plano teórico un control de esta reacción por parte de la melatonina podría prevenir este paso crucial para el desarrollo de alteraciones irreversibles en el hígado.

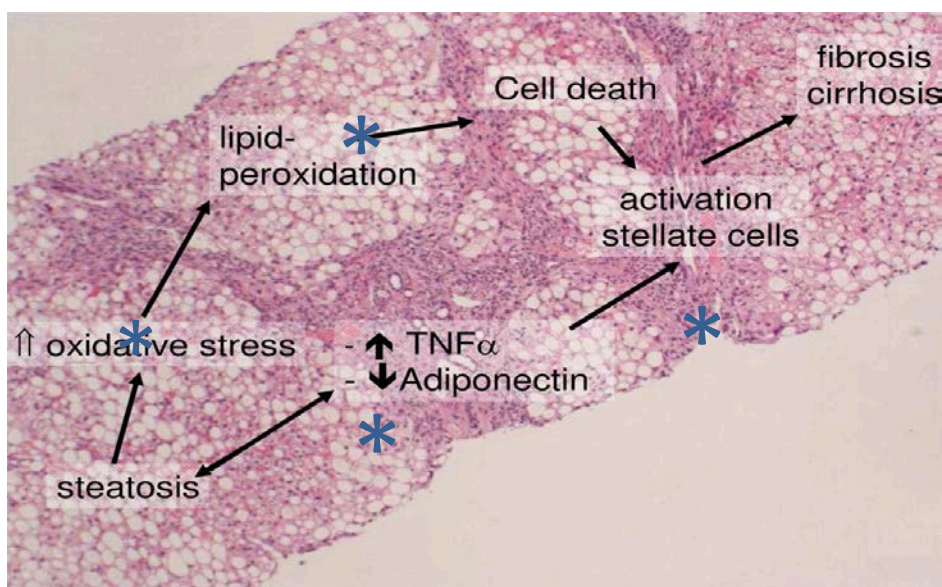


Fig.114. Lugar de acción de la melatonina en el proceso de transformación de NAFLD a NASH.

El metabolito aldehído de la reacción de peroxidación lipídica es el MDA, principal producto de la peroxidación de los ácidos grasos. Esta molécula es un biomarcador de la peroxidación lipídica y del estrés oxidativo. Además es el principal responsable de activar las células de Kupffer, que son las principales productoras de fibras de colágeno que se acumulan en el espacio extracelular. Pero también el MDA produce una activación del factor nuclear Kappa (NF- κ B), factor de transcripción que regula varias citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión. La generación de especies reactivas de oxígeno, radicales libres y anión superóxido, por inhibición de transferencia de electrones en la cadena respiratoria puede dar lugar a un aumento de la peroxidación lipídica, reacción que puede ser inhibida por la melatonina, como se demuestra en numerosos trabajos experimentales¹⁶⁸.

La melatonina es también un “scavenger” de radicales libres, mucho más potentes que los utilizados habitualmente en la clínica. Por último la melatonina aumenta la producción de enzimas con efecto antioxidante como: superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa¹⁶⁸.

8.2. MODELO EXPERIMENTAL: ANIMALES Y DIETA

Se han realizado numerosas investigaciones y descrito numerosos modelos animales que semejan la NAFLD humana. El modelo ideal sería aquel que reflejara tanto la histología como la fisiopatología de la enfermedad en sus diferentes estadios.

Desde un plano teórico el modelo ideal es complejo y debería presentar esteatosis con escaso grado de inflamación, balonamiento celular y fibrosis perisinusoidal, incluso incremento de la susceptibilidad a padecer tumores. Además estos animales deberían presentar obesidad, resistencia a la insulina, dislipemias y alteraciones del perfil adiposo corporal.

Por supuesto el modelo debe de ser reproducible, fiable, sencillo, predecible y económico. Desgraciadamente no existe ningún modelo animal en la actualidad que refleje completamente todas estas alteraciones de la histología y la fisiopatología.

En algunos modelos de animales modificados genéticamente ocurre primero la esteatosis y con posterioridad la esteatohepatitis, en otros este progreso no ocurre de forma directa.

Los modelos de hipernutrición más o menos crónica, suelen ser más adecuados, ya que las anormalidades metabólicas y el daño estructural hepático suele estar en consonancia con los acontecimientos que ocurren en el humano.

Los modelos con modificación de la dieta pueden agruparse en varias categorías (Fig.115):

- Modelos con dieta alta en grasas: dietas con entre un 30 y 50% de la ingesta a base de grasas.
- Modelos con dietas deficientes en metionina y colina: dieta deficitaria en antioxidantes hepáticos (esenciales para la β -oxidación hepática y la producción de VLDL). Koca¹⁶ obtuvo ratas con hígado esteatósico en 8 semanas.
- Modelos con dietas deficientes solo en colina: desarrollan esteatosis pero con menor grado de inflamación y fibrosis severa.
- Modelos con dietas con suplementos de colesterol y colatos: utilizadas para modelos de aterosclerosis, se observó que producían un efecto sobre el hígado muy marcado.
- Modelos con dietas altas en fructosa-sacarosa: carbohidratos mono y disacáridos que afectan al metabolismo de una forma muy similar al humano cuando ingiere gran cantidad de estos productos.
- Modelos con dietas combinadas: muy similares a la composición de las denominadas “comidas rápidas”, son ricas en fructosa (bebidas refrescantes) y en grasas (carne de hamburguesas).

Modelos nutricionales	Obesidad	Resistencia a la insulina	Citoquinas /adipoquinas en plasma	Dislipemia	Elevación de transaminasas	Histología hepática			
						Esteatosis	Inflamación	Balanciamiento hepatocelular	Fibrosis
Dieta alta en grasas	Si/no/no descrita	Si/ no descrita	\uparrow TNF α \downarrow adiponectina	Si/no/no descrita	Si/no	Si/no	Si/no	Si/no descrito	Si/no/no descrita
Dieta con déficit de metionina y colina	IPÉRDIDA DE PESO!	No	\uparrow IL-1 β , IL-6, TNF α	\downarrow Triglicéridos \downarrow colesterol	Si	Si	Si	No descrito	Si
Dieta con déficit de colina	Si	Si	No descrito	Si	No/ leve	Si	Si	No descrito	Leve (>90d)
Dieta aterogénica (colesterol y colato)	Si	Si	\uparrow TNF α	Si	Si	Si	Si	Si (al añadir grasa)	Si
Dieta alta en fructosa/sacarosa	No	Si	\uparrow IL-1 β , IL-2, IL-6	Si	No	Si	Si/no	No descrito	Si/no descrita
Dieta combinada (alta en fructosa y alta en grasa)	Si	Si	\uparrow leptina	Si	Si	Si	Si	No descrito	Si
Dieta de cafetería	Si	Si	No descrito	No descrito	No descrito	Si	Si	No descrito	No descrita

Fig.115. Modelos de NAFLD y NASH en ratones inducidos por modificaciones dietéticas.

En nuestro estudio, la dieta utilizada reúne las siguientes características:

- Alto contenido en grasa saturada (25 %).
- Deficiente en metionina (<1/4 de las necesidades) y colina (1/6 de las necesidades).
- Suplementada con 2 % de colesterol y 0,5 % de colato sódico.

La mayoría de estos modelos se han descrito en roedores existiendo muy pocos modelos en grandes animales.

También existen modelos sobre animales modificados genéticamente, todos ellos en roedores, como se muestra en la Fig.116. Hay diferentes modelos genéticos según sean de origen natural o modelos con mutaciones genéticas inducidas. Los modelos de esteatosis hepática en ratones monogénicos no traducen del todo la etiopatogénesis de la esteatosis humana, pero pueden proporcionar resultados valiosos sobre sucesos particulares en la patogenia de esta enfermedad.

Modelos nutricionales	Obesidad	Resistencia a la insulina	Dislipemia	Histología hepática			
				Esteatosis	Esteatohepatitis	Balanceo hepatocelular	Fibrosis
Ratones ob/ob	Si	Si	Si	Si	No espontáneamente (sí con dieta)	No descrito	No (resistentes)
Ratones db/db	Si	Si	No descrita	Si	No espontáneamente (sí con dieta)	No descrito	No espontáneamente (sí con dieta)
Ratas obesas de Zucker	Si	Si	Si	Si	No espontáneamente (sí con dieta)	No descrito	No (resistentes)
Ratones lipoatróficos (SREBP-1c)	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Ratas con sobreexpresión de SREBP-1a	No	Si	Si	Si	Si (con dieta)	No descrito	No descrita
Ratones AOX-/-	No	No	No descrita	Si	Si	No descrito	No
Ratones KK-A	Si	Si	No descrita	Si	No espontáneamente (sí con dieta)	No descrito	No espontáneamente (sí con dieta)
Ratones MAT1A -/-	No	No	No	Si	Si	No descrito	Si
Ratones NRF1 -/-	No descrita	No descrito	Si	Si	Si	No descrito	Si
Ratones PTEN flox/flox	No descrita	Hipersensible	No descrita	Si	Si	No descrito	Si
Ratones PPAR-α	No	No	No descrita	No (sí en estado de hambre)	No	No descrito	No
Ratas obesas de OLETF	Sí (leve)	Si	Si	Si	Si (con dieta)	Si (con dieta con dieta combinada)	Si (con dieta)

Fig.116. Modelos de NAFLD y NASH en ratones modificados genéticamente.

Los modelos en grandes animales son caros y solo disponibles en centros especializados, pero son una oportunidad única de estudiar en el mismo grupo de animales y de forma seriada todos los procesos que conducen a una NASH (a través de biopsias seriadas), además estos modelos asemejan, mucho más que los modelos en roedores, la anatomía, la histología y la fisiología humana.

El hígado porcino es muy similar anatómica y estructuralmente al humano y se nos ofrece como el modelo ideal para realizar estos experimentos. También se ha descrito una cierta resistencia de los cerdos a padecer esteatosis a pesar del marcado incremento de peso y del síndrome metabólico secundario a la modificación dietética.

Existen pocos modelos de esteatosis hepática en grandes animales, y en la mayoría de ellos se ha inducido el daño hepático mediante la administración de tóxicos como el alcohol.

Mets²²⁷ realizó un estudio con cerdos, que desarrollaron esteatosis mediante la administración de 1g/kg de alcohol con agua (1:3) a través de sonda nasogástrica durante 16 días, aunque el trabajo no estaba diseñado para obtener animales para el estudio de la esteatosis hepática. Este modelo, basado en la adición de un tóxico a la dieta no puede utilizarse para el estudio de la NAFLD como es obvio.

Spannbauer²²⁸ consiguió esteatosis en cerdos tanto con ingesta enólica aislada como con dieta deficiente en proteínas y con la suma de ambos modelos.

Quizás el único modelo de NAFLD/NASH diseñado en grandes animales es el de los cerdos Ossabaw miniature pigs. Estos cerdos procedentes de una isla cercana al estado de Georgia en los EE.UU. fueron llevados por los conquistadores españoles en el siglo XVI y criaron libremente en la isla presentando un cierto endogamismo que los hacía susceptibles a alteraciones metabólicas cuando eran sometidos a una dieta hipermetabólica aterogénica. Este fue el primer modelo de NAFLD/NASH descrito en grandes animales producido por una manipulación dietética.

En 2009, el equipo de Lee et al.²²⁹ describieron por primera vez un modelo de NASH en grandes animales producido por una manipulación dietética, utilizando cerdos Ossabaw miniature pigs.

En 20015, Liang et al.²³⁰ describen un modelo de NASH en cerdos Ossabaw miniatures Pigs con cambios histológicos en el hígado (degeneración baloniforme,

fibrosis hepática, acumulo de células de Kupffer. Estos cerdos sin embargo no desarrollaron esteatosis macrovesicular.

Dado que estos animales se encuentran en peligro de extinción y son en la actualidad una especie protegida el modelo es poco utilizable en la actualidad.

Un aspecto importante de este modelo es que los cerdos no desarrollaron esteatosis macrovesicular, a pesar de que desarrollaran un aumento de peso y síndrome metabólico, un hecho que los autores no saben explicar. A pesar de que no existe apenas bibliografía a este respecto, una explicación que aportan sería que estos animales no mostraban niveles de triglicéridos muy elevados, por tanto se sospecha que la esteatosis macrovesicular puede estar relacionada con la exportación de triglicéridos desde los hepatocitos en forma de VLDL. Otro hallazgo es la aparición de células de Kupffer que no es típico de la esteatosis en humanos.

Por lo tanto este modelo, aunque consigue desarrollar mediante dieta un hígado esteatósico, no consigue un modelo histológico que sea extrapolable al ser humano. A diferencia de los estudios en cerdos Ossabaw, nuestro modelo de dieta consiguió altos grados de infiltración grasa hepática a expensas de esteatosis macrovesicular, sin datos de esteatohepatitis.

En nuestro trabajo utilizamos un modelo experimental en el que reproducimos una esteatosis en grandes animales, utilizando el cerdo White-Landrace. Dicho modelo es original y suficientemente probado en estudios anteriores de nuestro grupo y que tiene la particularidad de que únicamente mediante manipulación dietética, sin utilizar fármacos o tóxicos algunos hemos logrado grados de esteatosis controlados y muy elevados. No existe ningún modelo publicado hasta la fecha que induzca, sin la utilización de sustancias lesivas para el hígado, o una dieta excesiva en grasas o fructosa (habitualmente con suplementos de sales biliares y colesterol), o un déficit de elementos necesarios para la beta oxidación (colina y metionina) un grado de esteatosis macrovesicular similar al nuestro, en tan poco tiempo y con unas mínimas repercusiones en la fisiología del animal.

Habitualmente las dietas ricas en grasa empleadas inducen una obesidad en el animal con incrementos sustanciales de peso. Esto ocurre para cualquier especie animal utilizada, murina, bovina, canica, primates, roedores, gatos etc.

Otra de las fortalezas de nuestro modelo experimental es que nos permite comprobar el daño hepático y cuantificar la esteatosis mediante la realización de biopsias hepáticas antes y después del desarrollo de la esteatosis, en muchos modelos murinos esto no es posible y en el humano casi ningún autor las realiza.

Todos los animales utilizados alcanzaron una esteatosis de más del 40%, con un máximo del 95%, pero es que en casi el 75 % fue mayor del 70 %. En trabajos consultados los autores alcanzan cifras mucho más dispares y de menor porcentaje.

En estudios anteriores de nuestro grupo ya a las 8 semanas del inicio de la dieta existía infiltración grasa, alcanzando un máximo hacia los 3 meses, antes de aparecer fenómenos de fibrosis.

En modelos murinos la esteatosis es alcanzada mucho antes evidentemente (entre 12 y 20 semanas). Para nuestro estudio preferimos animales con un grado muy elevado de esteatosis sin que presentaran alteraciones histológicas irreversibles.

Tras finalizar el periodo de dieta esteatósica encontramos que existían ciertas diferencias en el grado de NAFLD encontrado. La variabilidad de las cifras de esteatosis obtenidas tras el periodo de dieta especial, aunque ciertamente muy escasa se debió a que la dieta era ingerida ad libitum, sin control por parte de los cuidadores de la cantidad de la misma, y probablemente también a que la pequeña disparidad de los pesos de los animales al inicio pudiera haber condicionado tanto la cantidad de ingesta como la velocidad con que se produjo la infiltración grasa del hígado.

La dieta fue formulada por el equipo del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Esta dieta no incluye alcohol ni ningún tóxico y semeja en gran medida las condiciones de generales de los pacientes con esteatosis hepática.

Los animales esteatósicos presentaban un aspecto normal, eran activos y dinámicos, todos ganaron peso con facilidad y no presentaban apenas alteraciones cutáneas que pudieran aparecer si la formulación dietética adoleciera de ciertos principios inmediatos.

8.3. ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA

8.3.1. VÍA DE ADMINISTRACIÓN

En nuestra serie la melatonina fue administrada por vía oral en una sola toma, mezclada con el alimento, asegurándonos de que el animal la ingería en todos los casos. Aunque existían formulaciones de melatonina via parenteral (vía I.V. o peritoneal), preferimos la vía oral por semejarse mas a la forma de administración del fármaco en el humano. Otros autores, principalmente en modelos experimentales murinos, utilizan la vía intraperitoneal para asegurarse una absorción completa y una vía de acceso controlable y de fácil utilización repetidas veces. Estos modos de administración, aunque fáciles de utilizar, poseen el inconveniente de que el fármaco debe ser disuelto en etanol absoluto, que aunque en pequeñas cantidades, es un producto directamente tóxico para el hígado.

La melatonina, por su fácil y rápida absorción en tramos altos del sistema digestivo (una dosis oral de melatonina de 2 mg. alcanza concentraciones plasmáticas máximas entre los 30 y 60 minutos de su ingesta, independientemente de si se ingiere con o sin alimentos) puede ser administrada sin problemas por esta vía, y además es la vía de elección en pacientes humanos.

Se dispone, para uso humano de melatonina de liberación lenta, la cual permanece elevada en el plasma durante 5-7 horas tras su administración, aumentando sus valores cuando se ingiere con alimentos.

No creímos necesario determinar los niveles de la hormona en plasma ya que la interpretación de los datos podría resultar equívoca, la melatonina posee un ritmo circadiano de secreción con niveles basales muy variables en dependencia de la situación clínica, estrés etc. Tras la ingesta, los valores permanecen elevados durante 3-4 horas pasadas las cuales los niveles retornan a situación basal, siendo el tiempo de semivida de 30-40 min.

Los valores endógenos de melatonina plasmática en el humano se sitúan entre los 5 y los 100 pg/ml. En dependencia de los ritmos de sueño-vigilia, aumentando su concentración a 2.000 o 3.000 pg/ml. tras la administración exógena del preparado.

8.3.1. DOSIS DE MELATONINA

La melatonina se ha administrado en dosis variables, cada vez mas crecientes, vista su inocuidad y posiblemente su falta de efecto eficaz en determinados experimentos.

En experimentos en ratas a las cuales se les inducía una NAFLD por medio de dieta especial rica en grasas, las dosis de melatonina administrada varían desde 0,5 a 10 mg/kg²¹³. Pan²¹² utiliza melatonina a dosis de 2,5, 5 y 10 mg/kg via intraperitoneal.

La dosis habitualmente utilizaba en humanos es mucho menor, del orden de 0,3 a 5 mg dos veces al día²²¹. Es de destacar que, aunque la melatonina ha demostrado su inocuidad, no se utiliza en el humano a dosis similares a las utilizadas en animales de experimentación, aunque no se ha establecido su utilidad para el tratamiento de la NAFLD.

En gran parte de los trabajos, tanto clínicos como experimentales, en los que se utilizan dosis variables de melatonina, habitualmente es la dosis más alta la que resulta más efectiva, tanto en disminuir los niveles de enzimas hepáticas como en el grado de infiltración grasa, comparada con las dosis más bajas. Se considera una dosis moderada 5 mg/kg/día y una dosis elevada 10 mg/kg/día.

En nuestro trabajo preferimos utilizar la dosis considerada de mayor utilidad en otros experimentos similares.

8.4. ESTUDIO PILOTO. ESTUDIOS PREVIOS

Pese a las evidencias encontradas en la literatura sobre el efecto de la melatonina en la esteatosis hepática y el metabolismo lipídico en modelos animales de NAFLD, decidimos realizar un estudio piloto previo con 6 cerdos a los cuales se les indujo una esteatosis con nuestro modelo de dieta, con el fin de comprobar los efectos de la misma. Comprobamos mediante biopsia que todos estos animales habían desarrollado una esteatosis hepática grave (>80% en todos los animales). Desconocíamos los efectos de la melatonina sobre el modelo porcino y con grados elevados de infiltración grasa. Los resultados de este estudio demostraron que un número significativo de los animales mejoraron la esteatosis tras un mes de tratamiento con melatonina oral a dosis de 10 mg/kg/día (3 de los 6 animales mejoraron el grado de esteatosis tras la adicción del fármaco). Estos resultados y las evidencias obtenidas por otros autores en modelos murinos nos animaron a realizar un estudio más completo y controlado en grandes animales.

8.5. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL HÍGADO ESTEATÓSICO

Valoramos una serie de características macroscópicas en los hígados esteatósicos, tanto en la primera como en la segunda intervención: tamaño, bordes, coloración, consistencia y presencia de ascitis.

Por lo general, en los casos de esteatosis hepática leve, es posible que no se afecte macroscópicamente la víscera. Sin embargo, en los casos de infiltración grasa severa, se produce por lo general un aumento de tamaño de la víscera, haciéndose más amarillenta, hasta que en casos extremos puede transformarse en un órgano amarillo, brillante, blando y friable al tacto.

En la primera biopsia de nuestro estudio, la totalidad de los animales de los 4 grupos de estudio presentaron un hígado ligeramente aumentado de tamaño, de bordes romos, de aspecto amarillento y consistencia blanda. 11 de los 31 animales presentaban ascitis (32,3%).

Sin embargo, los 6 animales del grupo control (no esteatósicos) presentaron un hígado de tamaño normal, bordes agudos, coloración rojiza y consistencia dura. Solo uno de ellos (16,7%) presentó ascitis (ligera).

En la segunda biopsia, el tamaño del hígado estaba aumentado en 29 animales (93,5%). Los bordes hepáticos eran romos en 28 de los animales (90,3%). El color del hígado seguía siendo amarillento en 21 animales (67%). La consistencia del hígado era blanda en 25 de los animales (80,7%). En ninguno de ellos se observó la presencia de ascitis.

En conclusión, las características macroscópicas del hígado en la primera biopsia nos hicieron sospechar un alto grado de infiltración grasa, tal y como luego se demostró con el análisis histológico. Las características macroscópicas del hígado no se modificaron de manera considerable de una a otra biopsia para poder sacar conclusiones al respecto, además las características que mejoraron en la segunda biopsia, no se correspondieron sólo con los animales que habían recibido melatonina. También hay que tener en cuenta que aunque la descripción de las características macroscópicas fue realizada por un solo observador, para intentar unificar criterios, la interpretación de las mismas está sujeta a subjetividad.

8.6. PESO DE LOS ANIMALES

El primer parámetro que podría modificar la melatonina sobre el modelo experimental fue el peso de los animales, ya que las dietas que inducen NAFLD suelen inducir también incremento del peso o franca obesidad. Hemos encontrado que todos los animales, independientemente del grupo de estudio al que pertenecieran, incrementaron su peso al finalizar el periodo de tratamiento. No hemos encontrado estudios experimentales en modelos murinos ni estudios en humanos que analizaran el peso tras la ingesta de dieta esteatósica y tras el tratamiento con melatonina, por lo tanto no podemos extrapolar nuestros resultados.

Nuestros animales, continuaran con la dieta esteatósica o no, y recibieran melatonina o no, incrementaron su peso al final del experimento. En el caso de los grupos 1, 3 y 4 este aumento fue estadísticamente significativo ($p=0.003$, $p=0.0043$ y $p=0.0043$ respectivamente). Sin embargo, no todos los animales incrementaron su peso en igual cuantía. Los animales de los grupos 1 y 2 (animales que continuaron con la dieta esteatósica) apenas incrementaron su peso frente a los animales que si dejaron de ingerirla (porcentaje de cambio para el grupo 1 y 2 fue de 4,52 y 0,91 respectivamente vs porcentaje de cambio para el grupo 3 y 4 de 15,58 y 13,72 respectivamente). Esta circunstancia puede indicar el gran efecto que la dieta presenta sobre el metabolismo del animal, asumiendo entonces que la dieta esteatósica previene el engorde del animal con el paso del tiempo, en contraste con los animales que si dejaron la dieta, los cuales engordaron de forma más acorde a su metabolismo convencional.

Realizamos la comparación por grupos para individualizar el efecto de la melatonina en los grupos que habían mantenido dieta esteatósica (grupos 1 y 2) o no habían mantenido dieta esteatósica (grupos 3 y 4) y también para individualizar el efecto de la dieta en los animales que habían sido tratados con melatonina (grupos 1 y 3) o no habían sido tratados con melatonina (grupos 2 y 4).

No hubo diferencias al comparar los grupos 1-2 y 3-4, que individualizan el efecto de la melatonina, por lo tanto no podemos concluir que la melatonina ejerza ningún efecto en el peso final del animal.

En los grupos que tomaron melatonina (grupos 1 y 3), el grupo que discontinuó la dieta esteatósica (grupo 3) aumentó más de peso de manera significativa ($p=0,014$), lo cual habla a favor de que la dieta esteatósica a largo plazo podría proteger del aumento de peso.

En los grupos que no tomaron melatonina (grupos 2 y 4), el grupo que discontinuó la dieta esteatósica (grupo 4) aumentó más de peso significativamente ($p=0,07$), lo cual también hace pensar en que la dieta esteatósica podría proteger del aumento de peso.

El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la dieta y no del tratamiento con melatonina

No encontramos en la literatura artículos similares en modelos de grandes animales, en los que se compare como influye la continuación o discontinuación de la dieta en el peso del animal. En el modelo de esteatohepatitis llevado a cabo en cerdos Ossabaw en 2015²³⁰ se observó que en el grupo de animales sometidos a dieta alta en grasas ganaron peso de manera continuada y mantenida según los controles realizados a las 8, 16 y 24 semanas. El grupo control también aumentó de peso de forma acorde a la fisiología del animal. La ganancia de peso en el grupo control fue estadísticamente menor que en el grupo de estudio en los tres tiempos, lo cual contrasta con los resultados de nuestro estudio. Si bien es verdad, que el grupo control de cerdos Ossabaw, no discontinúa la dieta esteatósica, sino que se alimenta de dieta normal durante todo el estudio, por lo tanto, no podría compararse con la variación de peso que experimentan nuestros animales al discontinuar la dieta.

En los modelos murinos, la discontinuación de la dieta rica en grasas supone una disminución del peso, aunque difícilmente podemos extrapolar los resultados obtenidos en nuestro estudio sobre el peso a los modelos en roedor, ya que el metabolismo y fisiología del animal es totalmente diferente.

8.7. ANÁLISIS SEROLÓGICOS: LÍPIDOS PLASMÁTICOS Y MARCADORES DE FUNCIÓN HEPÁTICA

En nuestro trabajo se han analizado marcadores lipídicos en plasma (colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos) y marcadores de daño hepático en plasma (B, AST, ALT, GGT Y FA).

8.7.1. LÍPIDOS PLASMÁTICOS

Los niveles de colesterol total, HDL y LDL alcanzados por los animales tras el periodo de dieta esteatósica (antes de ser sometidos, o no, al tratamiento con melatonina) triplican y cuatriplican los niveles basales del grupo control, lo cual hace suponer un importante efecto de la dieta sobre el metabolismo general de todos los lípidos. Esto sucede para las cifras de colesterol (total o unido a lipoproteínas), pero no se observa este efecto en los triglicéridos.

El nivel medio de TG, en los grupos 2, 3 y 4 disminuyó en el tiempo post con respecto al tiempo pre, de manera significativa ($p=0,043$) sólo en el grupo 4 (animales que discontinuaron la dieta y no se trataron con melatonina). Al comparar por grupos, el porcentaje de cambio difiere de manera estadísticamente significativa ($p=0,028$) entre los grupos 2 y 4 (el grupo 2 continuó con la dieta esteatósica y el grupo 4 la suspendió). Por lo tanto, la discontinuación de la dieta en los animales que no toman melatonina sí tiene un efecto en la variación de TG. Respecto a los niveles medios de TG, no podemos sacar muchas conclusiones, ni la discontinuación de la dieta, ni el tratamiento con melatonina genera un efecto sobre el porcentaje de cambio, y así lo confirma el modelo de regresión lineal. Sólo podríamos decir que la discontinuación de la dieta en los animales que no se tratan con melatonina genera un descenso de TG mayor.

Respecto al nivel medio de colesterol total, parece que la dieta juega un efecto importante sobre sus niveles, ya que los grupos 3 y 4 (los dos grupos de animales que discontinuaron la dieta) han disminuido significativamente ($p=0,043$ y $p=0,043$ respectivamente) los niveles de colesterol total. En los grupos que continúan la dieta, tomen o no melatonina, el nivel medio de colesterol total aumenta. Además si observamos la comparativa entre los grupos, el porcentaje de cambio varía de manera significativa ($p=0,02$ y $p=0,003$) al comparar los grupos que continuaron la dieta vs. los grupos que discontinuaron la dieta (grupo 1-3 y grupo 2-4). Por lo tanto, podemos concluir que el colesterol total disminuye de media en los cerdos que discontinúan la dieta, y que la melatonina no tiene un efecto significativo en la variación del colesterol total plasmático, y así se observa en el modelo de regresión lineal.

Algo similar ocurre con el nivel medio de colesterol HDL, desciende significativamente en los grupos que discontinúan la dieta esteatósica y el porcentaje de cambio es significativo ($p=0,08$) entre los grupos 1-3 (ambos grupos de animales tratados con melatonina con la diferencia de que el grupo 1 continuó la dieta y el grupo 3 no). En conclusión, la discontinuación de la dieta genera un efecto sobre el descenso medio de colesterol HDL, este efecto no lo podemos demostrar con la melatonina, y así lo confirma el modelo de regresión lineal.

El nivel medio de colesterol LDL varía en el mismo sentido que el colesterol total y el colesterol HDL, ya que desciende al eliminar el efecto de la dieta esteatósica, disminuyendo significativamente ($p=0,043$ y $p=0,043$) en los grupos de animales que dejan de consumir dieta esteatósica (grupos 3 y 4). El porcentaje de cambio, de nuevo varía significativamente ($p=0,02$ y $p=0,03$) entre los grupos 1-3 y 2-4.

Por lo tanto, al igual que en el caso del colesterol total y del colesterol HDL, la discontinuación de la dieta genera un efecto sobre el descenso medio de colesterol HDL, sin que se observe este efecto para la melatonina (modelo de regresión lineal).

En resumen, según los resultados de nuestro estudio, no se ha podido demostrar la efectividad de la melatonina en la reducción de ninguno de los marcadores lipídicos bioquímicos en plasma. Sin embargo, el cambio de una dieta rica en grasas saturadas

hacia una dieta estándar durante 4 semanas, sí que genera un descenso de los niveles plasmáticos de colesterol total y unido a lipoproteínas.

Sin embargo los datos que hemos obtenido contrastan con los encontrados en la literatura. Los primeros estudios realizados hace más de tres décadas señalaron un efecto de la glándula pineal sobre el metabolismo lipídico. La administración de extractos de glándula pineal en ratas disminuyó el colesterol en plasma, hígado, suprarrenal y testículo; mientras que la pinealectomía causó los efectos opuestos. El efecto reductor de la melatonina en el colesterol sérico ha sido documentado en la literatura ampliamente desde hace más de 30 años²³²⁻²³⁴.

Uno de estos estudios recientes es el trabajo de Pan et al.²¹² en 2006, en el que se evalúa el efecto protector de la melatonina sobre el hígado graso inducido mediante dieta en un modelo experimental murino. En este trabajo se demostró un efecto hipolipemiante de la melatonina, ya que la melatonina administrada a dosis de 5 o 10 mg/kg/día durante 12 días fue eficaz en la reducción de colesterol y triglicéridos plasmáticos.

El efecto de la melatonina como hipolipemiante se atribuye al aumento del catabolismo del colesterol, los ácidos biliares, la inhibición de la síntesis de colesterol y acciones directas en el tejido adiposo a través de receptores específicos. Hay que tener en cuenta que en este estudio, los autores pretenden evaluar el efecto de la melatonina como fármaco en la prevención del desarrollo de la esteatosis hepática, partiendo de niveles de colesterol y triglicéridos no muy elevados. El objetivo pues es diferente al de nuestro estudio, que pretende tratar la esteatosis hepática una vez instaurada y el descenso de unos niveles lipídicos en suero muy elevados. Podríamos especular que la melatonina podría ser eficaz en pacientes en los que las cifras de lípidos plasmáticos todavía no hubieran alcanzado cifras considerables o en pacientes con grados de infiltración grasa más moderados (en nuestro estudio la cifra menor de esteatosis fue del 40 %, muy por encima de las cifras de pacientes obesos mórbidos o diagnosticados de NAFLD).

En el trabajo publicado por Hatzis et al.²¹³ similar al estudio anterior, y cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la melatonina intraperitoneal en la prevención del estrés oxidativo al que se ha inducido un hígado esteatósico mediante dieta alta en grasas, los resultados no revelaron cambios en los niveles plasmáticos de lípidos tras la administración de melatonina intraperitoneal a dosis de 5 o 10 mg/kg/día, al igual que en nuestro estudio.

Hoyos et al.²¹⁴ en 2010 también demostraron una reducción del colesterol total y LDL en el grupo de roedores tratados con melatonina vía oral a dosis de 10 mg/L (administrada en el agua de bebida) y sometidos a la vez a dieta rica en colesterol. La melatonina también previno en este grupo el descenso del nivel de HDL.

En el estudio de Subramanian en 2007²¹⁸ se observó un descenso significativo de los niveles de colesterol, fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos en el hígado en el grupo de ratas tratadas con melatonina intraperitoneal a dosis de 0.5 y 1 mg/kg/día. En este estudio no se administra dieta rica en grasas, ni antes ni durante el estudio, las ratas se alimentan de dieta estándar.

Se han realizado diversos estudios en humanos intentando demostrar la capacidad hipolipemiente y reductora del daño hepático de la melatonina, con resultados contradictorios.

Cichoz-Lanch et al.²²⁰ demostraron en 2010 una disminución del nivel de triglicéridos en pacientes con diagnóstico histológico de EHNA a los que se había administrado un preparado de fosfolípidos más melatonina en dosis de 10 mg al día durante 4 semanas.

En otro estudio realizado por Gonciarz et al.²²¹ en 2010 sobre un grupo de pacientes diagnosticados de NAFLD mediante biopsia, con dos grupos de estudio, un grupo placebo y otro, a los que se había administrado melatonina en dosis de 10 mg al día durante 12 semanas, no consiguieron demostrar mejoría de los niveles lipídicos en el grupo de tratamiento. Los mismo autores publicaron en 2012 un trabajo similar tras un período de tratamiento con melatonina más largo (12 semanas mas) y con un

mayor tiempo de seguimiento, con los mismos resultados negativos.

Celinski et al.²²³ publicaron un estudio con 74 pacientes diagnosticados mediante examen histológico de NAFLD. Se demostró una disminución significativa de los niveles de TG y LDL en el grupo tratado con melatonina a dosis de 10 mg/kg/día durante 14 meses. Cabe destacar de este estudio, que la dosis de melatonina y el tiempo de tratamiento fueron superiores al resto de estudios, por lo que se podría interpretar la necesidad de un tratamiento prolongado, con dosis elevada de melatonina para conseguir un efecto hipolipemiente.

En conclusión, en la mayoría de los trabajos, ya sean en modelo experimental en roedor o en humanos, se consigue demostrar el efecto hipolipemiente de la melatonina a largo plazo (aunque estos resultados son todavía controvertidos). No tenemos una explicación clara para justificarlo. Hay que tener en cuenta por una parte, que la melatonina no protege contra las consecuencias de una dieta rica en grasas, incluyendo la absorción intestinal de lípidos que conduce a un aumento en la oferta de ácidos grasos libres al hígado y el aumento de síntesis de novo de ácidos grasos en el hígado. Otra razón que podría argumentar esta disparidad de resultados es que en nuestro modelo experimental partimos de una esteatosis hepática establecida, con unos niveles sanguíneos de lípidos elevados de manera crónica, situación que no ocurre en el resto de estudios experimentales, ya que la melatonina se administra de manera concomitante a la dieta alta en grasas a modo de prevención. En algunos estudios²⁸ incluso los animales se alimentan de dieta estándar.

Los resultados de nuestro estudio podría llevarnos a pensar que la melatonina carece de efecto hipolipemiente en situaciones de niveles serológicos de lípidos elevados de manera persistente.

8.7.2. MARCADORES DE FUNCIÓN HEPÁTICA

Desde el punto de vista teórico, la melatonina tendría un efecto citoprotector hepático, que se traduciría en una disminución de las enzimas hepáticas, que reflejan el daño celular. Así pues cabría encontrar o bien una disminución de los valores

elevados (si se elimina la noxa) o bien una falta de progresión (si la noxa persiste). Precisamente nuestro trabajo se diseñó para corroborar estos extremos, ya que incluimos grupos de animales en los cuales se les mantenía el estímulo para producir el daño hepático (dieta esteatósica) y animales a los cuales se les eliminó este estímulo.

La bilirrubina disminuyó de media en todos los grupos, siendo significativo ($p=0,017$) este descenso en el grupo 2 (animales que continuaron la dieta y no se trataron con melatonina). No hubo diferencias en la comparativa entre grupos en el porcentaje de cambio pre-post de B, por lo que ni la dieta ni la melatonina generan un efecto en los niveles de B, como también se confirma mediante el modelo de regresión lineal.

El valor medio de AST descendió en los grupos 1, 2 y 4, siendo significativo ($p=0,008$ y $p=0,043$) este descenso en el grupo 2 y 4 (animales que siguieron con la dieta esteatósica no tratados con melatonina y animales que discontinuaron la dieta y no se trataron con melatonina). En el grupo 3 (animales que tomaron melatonina y discontinuaron la dieta), aumentó la media de AST. El porcentaje de cambio difiere de manera estadísticamente significativa sólo entre los grupos 3-4 ($p=0,047$). Ambos grupos han discontinuado la dieta esteatósica, el grupo 3 tomó melatonina y el grupo 4 no tomó melatonina. Se concluye que la melatonina tiene un efecto sobre el cambio porcentual pre-post de AST en los animales que no continúan la dieta esteatósica. Según el modelo de regresión lineal, los pacientes con melatonina aumentan en 57,25 puntos el nivel medio del porcentaje de cambio de AST.

Con respecto a la ALT, en nuestro estudio, encontramos resultados contradictorios. El valor medio de ALT aumenta de media significativamente ($p=0,043$ y $p=0,042$) en los dos grupos que discontinúan la dieta (grupos 3 y 4), independientemente del efecto de la melatonina y al contrario de lo que cabría esperar, que sería una mejoría de los parámetros de citolisis hepática al normalizarse la dieta. En los grupos que continúan la dieta esteatósica (grupos 1 y 2) el valor medio de ALT disminuye discretamente, sin ser este descenso significativo. Estos resultados no son los esperables en cuanto al efecto de la dieta en la variación de ALT. Tampoco podemos relacionar el efecto de la

melatonina con dicha variación. Al comparar por grupos, existen diferencias significativas entre los grupos 1-3 y 2-4. Por lo tanto el tipo de dieta supone una diferencia en cuanto a la variación media de ALT, independientemente de que los animales se hayan tratado o no con melatonina. El modelo de regresión lineal confirma el efecto significativo de la dieta y no del tratamiento con melatonina sobre el porcentaje de cambio de ALT.

Tras analizar los datos en los diferentes grupos de estudio, podemos observar que el valor medio de GGT disminuyó en los dos grupos de animales que discontinuaron la dieta (grupos 3 y 4) de manera estadísticamente significativa ($p=0,043$ y $p=0,043$). Dicho efecto es el esperado, ya que al normalizar la dieta, mejoran los parámetros de función hepática. En los grupos que continuaron con la dieta esteatósica (grupos 1 y 2) también se observó una disminución del valor medio de GGT más discreta y no significativa. No hubo diferencias significativas al comparar por grupos en el porcentaje de cambio pre-post de GGT, por lo que ni la dieta ni la melatonina generan un efecto en los niveles de GGT, como demuestra también el modelo de regresión lineal.

Observamos que la tendencia de FA es a disminuir de media en todos los grupos menos en el grupo 2 (animales que continuaron con la dieta esteatósica y no fueron tratados con melatonina). En el grupo 4 (animales que discontinuaron la dieta y no tomaron melatonina) este descenso es significativo ($p=0,043$). No hubo diferencias al comparar por grupos en el porcentaje de cambio pre-post de FA, por lo que ni la dieta ni la melatonina generan un efecto en los niveles de FA, como demuestra también el modelo de regresión lineal.

Podemos concluir que en nuestro estudio, no hemos encontrado ese efecto citoprotector de la melatonina cuando se mantiene la noxa que produce la lesión hepática. Tampoco encontramos diferencias significativas respecto a las enzimas hepáticas en los grupos que discontinuaron la dieta esteatósica, recibieran o no melatonina, por lo tanto no podemos sacar conclusiones en cuanto a que la normalización de la dieta genere una mejoría en los niveles enzimáticos, al menos en las 4 semanas que duró nuestro estudio.

Comparando estos resultados con lo publicado en la literatura, encontramos que en el estudio, Pan et al.²¹² se logró demostrar que la administración de melatonina intraperitoneal a dosis de 5 y 10 mg/kg/día durante 12 días fue eficaz en la reducción en suero de ALT, AST. La diferencia con nuestro trabajo es que los autores anteriores administraban de forma conjunta la dieta esteatósica y la melatonina a los animales de experimentación y nuestro trabajo parte de animales con una NAFLD ya establecida, es decir quizá la melatonina pudiera tener un efecto preventivo de la lesión hepática cuando es administrada de forma temprana (antes de producirse el acúmulo graso en el hepatocito), siendo su efecto nulo cuando ya está establecida la NAFLD.

El trabajo realizado por Hatzis et al.²¹³ nos aporta un poco de luz a este respecto. Los autores pudieron demostrar que la necrosis celular hepática fue significativamente menor en las ratas que habían recibido dieta rica en grasas y melatonina a dosis de 5 mg o 10 mg/kg/día vía intraperitoneal durante 4-8 semanas, encontrando que los niveles de AST y ALT fueron menores tras recibir el fármaco. Sin embargo en su trabajo un grupo de animales se les indujo una esteatosis (por medio de la dieta) antes de ser tratados con melatonina, pues bien, este último grupo de animales no obtuvo ningún efecto citoprotector hepático, al igual que los animales de nuestro estudio. Cabe concluir que la melatonina es ineficaz como tratamiento una vez establecida la NAFLD no debe utilizarse pues como tratamiento de un hígado graso ya instaurado ni como fármaco para reducir unos niveles plasmáticos de enzimas crónicamente elevados.

En nuestro trabajo, los grados de NAFLD alcanzados tras la dieta fueron muy elevados, mucho más que los obtenidos en estudios similares con otros modelos experimentales, quizá con grados más moderados de infiltración grasa la melatonina pudiera tener algún efecto, este extremo debería ser investigado.

Hoyos et al.²¹⁴ en 2010 no consiguieron demostrar un descenso de enzimas hepáticas en los grupos de ratas tratadas con melatonina vía oral a dosis de 10 mg/L en el agua de bebida durante 3 meses.

En el estudio de Tahan et al.²¹⁶ se observó una disminución de AST, ALT y FA en el grupo de ratas alimentadas con dieta esteatósica (deficiente en metionina y colina) y tratadas a la vez con melatonina a dosis de 50 mg/kg/día vía intraperitoneal durante un mes. Este estudio también tuvo como objetivo la prevención de la esteatosis hepática y de citolisis hepática.

En 2015, Agil et al.²¹⁷ publicaron un trabajo en el que también demostraron una reducción de la disfunción hepática mitocondrial en ratas obesas. Una de las conclusiones del estudio fue que el tratamiento con melatonina en una dosis de 10 mg/kg/día vía oral durante 6 semanas disminuye los niveles séricos de ALT significativamente en el grupo de ratas obesas tratadas con melatonina con respecto al grupo de ratas obesas no tratadas. En este estudio sí que se parte de animales a los que se ha inducido una obesidad y probablemente esteatosis hepática, por lo que podría parecerse más a nuestro modelo, sin embargo, la mejoría de los distintos parámetros no se comparan con los niveles basales, sino que se comparan con un grupo control, ya que a las ratas obesas no se les realiza biopsia antes de empezar a ser tratadas con melatonina.

También se ha experimentado la melatonina en el humano como fármaco protector hepático.

Cichoz-Lanch et al.²²⁰ consiguieron demostrar diferencias significativas sólo en la reducción de GGT en pacientes diagnosticados por NAFLD mediante biopsia y sometidos a una dosis de 10 mg/día de melatonina vía oral durante 4 semanas.

Gonziaz et al.²²¹ en 2010 encontraron que, comparados con un grupo de pacientes control sin tratamiento la melatonina logró un descenso de las enzimas hepáticas (AST y GGT) significativamente sólo en el grupo tratado con melatonina, tras 12 semanas de tratamiento a dosis de 10 mg/día. Este estudio demuestra por primera vez en humanos que tres meses de tratamiento con melatonina, mejora significativamente las enzimas hepáticas plasmáticas en pacientes con NAFLD. El hecho de que todos los individuos se sometieran a dieta y ejercicio está sujeto al prejuicio del efecto de un mayor autocontrol (cambios imperceptibles en la dieta, ejercicio físico u otras

costumbres) que pueden ser variables de un individuo a otro, sobretodo en los pacientes con NASH. Los autores no reportan datos sobre cambios en la infiltración grasa del hígado, ya que no practicaron biopsias a los pacientes después del experimento.

En el trabajo publicado por los mismos autores en 2012 donde presentaban el seguimiento de sus primeras observaciones²²², no se modificaron los resultados obtenidos en 2010 a pesar de haber alargado el tratamiento con melatonina 12 semanas más. El defecto de este estudio es nuevamente la ausencia de estudios histológicos tras el tratamiento.

Estos trabajos demuestran un efecto positivo de la melatonina a corto y medio plazo, al menos medida en parámetros serológicos, obviamente la NAFLD no es una enfermedad aguda que necesite un tratamiento puntual.

El estudio de Gonciarz et al.²²⁴ del 2013 sobre el efecto de la melatonina en la resistencia a la insulina, los niveles de leptina, adiponectina, resistina, ghrelina y las enzimas hepáticas en pacientes con EHNA demostrado histológicamente, observaron una disminución significativa de enzimas hepáticas (ALT, AST, GGT) al final del tratamiento con melatonina con respecto a los niveles basales. Se confirma también lo observado en estudios anteriores en cuanto a la acción de la melatonina en la disminución de enzimas hepáticas, que traduce una disminución del daño o lesión hepática. Los autores no reportan datos sobre cambios en la infiltración grasa del hígado, ya que no practicaron biopsias a los pacientes después del experimento.

En el estudio de Celinski et al.²²³ año 2014 tras 14 meses de tratamiento con melatonina a dosis de 10 mg/kg/día vía oral se demostró que la melatonina reduce significativamente los niveles de enzimas plasmáticas y disminuye también los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF alfa), lo cual hacía pensar en una falta de progresión o una disminución de los fenómenos inflamatorios que conducen la NAFLD a una NASH (los niveles de IL-6 se han relacionado con la progresión a fibrosis. Este estudio utiliza una dosis de melatonina mucho mayor que los estudios anteriores (10 mg/día vs. 10 mg/Kg/día) y una duración de su

administración mayor que en el resto de estudios en humanos. Adolece también en que solo se obtuvo una biopsia hepática, tras finalizar el periodo de tratamiento, en solo 9 pacientes de los 70 que fueron reclutados. Quizá lo más interesante de este estudio es que la melatonina puede frenar la progresión de la NAFLD a NASH o incluso revertir los efectos a través de una mejora en el metabolismo de los lípidos (efectos antioxidantes) y a través de su efecto antiinflamatorio (disminución de mediadores proinflamatorios).

En conclusión, nuestros resultados contrastan con los de la literatura científica, ya que en la mayoría de estudios, tanto en modelos experimentales como en ensayos en humanos, se ha conseguido demostrar ese efecto citoprotector de la melatonina, en nuestro trabajo no hemos podido demostrarlo.

Tampoco hemos demostrado que la discontinuación de la dieta esteatósica hacia una dieta normalizada proteja de este aumento de enzimas hepáticas, pese a que se ha aceptado ampliamente que la reducción de peso por modificaciones dietéticas y el aumento de actividad física mejora dichos parámetros³⁸.

Ueno et al.²³⁵ demostraron que la dieta restringida y la realización de ejercicio en pacientes obesos con NAFLD disminuyó los niveles de ALT y AST, así como el grado de esteatosis en la biopsia hepática después de los 3 meses de tratamiento. Suzuki et al.²³⁶ han demostrado que reducir el peso al menos 5% y el ejercicio regular disminuyó significativamente el nivel de ALT en estos pacientes.

8.8. ANATOMÍA PATOLÓGICA

Al analizar las muestras histológicas, hemos valorado una serie de parámetros cuantitativos y cualitativos:

- Grado o porcentaje de esteatosis (medida mediante visión directa del patólogo y mediante un programa informático de análisis de imagen).
- Morfología de la esteatosis (macro o microgotular).
- Distribución de la esteatosis (periférica o centrolobulillar).
- Presencia o no de fibrosis.

En cuanto a la morfología de la esteatosis, ha sido macrovacuolar en todas las muestras de nuestro estudio, tanto en el tiempo pre como en el tiempo post. La esteatosis macrovacuolar es la lesión clásica vinculada a la esteatosis presente en la obesidad, el alcoholismo crónico y la diabetes tipo 2. La esteatosis microvesicular sin embargo, ocurre en otra variedad de enfermedades genéticas y adquiridas, incluyendo enfermedades metabólicas, el hígado graso del embarazo, el síndrome de Reye y reacciones hepatotóxicas a drogas y toxinas.

La distribución de la esteatosis, fue preferentemente centrolobulillar, es decir, los hepatocitos con infiltración grasa se situaban de manera predominante en el centro del lobulillo, cercanos a la vena centrolobulillar. La acumulación de triglicéridos en unas u otras zonas del lobulillo hepático depende de la causa: en la congestión hepática que genera isquemia (insuficiencia cardíaca por ejemplo) los triglicéridos se acumulan preferentemente en el centro del lobulillo, en el alcoholismo y en la obesidad ocurre lo mismo. La esteatosis perilobulillar es típica de los largos períodos de ayunos y de la agresión por tóxicos.

En menos de la mitad (45,2%) de muestras de la primera biopsia había cierto grado de fibrosis, sin asociar actividad inflamatoria. En la segunda biopsia hubo 16 muestras con fibrosis (51,61%). No se observó infiltración inflamatoria ni otros datos histológicos de esteatohepatitis. El grado de fibrosis alcanzado fue leve en 100% de las muestras.

8.8.1. GRADO DE ESTEATOSIS ANALIZADO POR VISIÓN DIRECTA DEL PATÓLOGO

El grado medio de esteatosis aumenta en los grupos 1 y 2 (animales que mantienen la dieta esteatósica) y disminuye en los grupos 3 y 4 (animales que discontinúan la dieta esteatósica), siendo estadísticamente significativa ($p=0,042$) esta disminución en el grupo 4 (animales que discontinúan la dieta y no toman melatonina). Estos resultados hablan a favor del potente efecto que tiene la discontinuación de una dieta alta en grasas en la mejoría del grado de infiltración grasa, de manera independiente al tratamiento o no con melatonina.

Al comparar por grupos, observamos que existen diferencias significativas ($p=0,05$ y $p=0,03$) en cuanto a porcentaje de cambio de esteatosis al comparar los grupos 1-3 (los dos grupos han tomado melatonina, el grupo 1 ha seguido con la dieta esteatósica y el grupo 3 la ha discontinuado) y 2-4 (ninguno de los dos grupos han tomado melatonina, el grupo 2 continuó con la dieta y el grupo 4 la discontinuó). Estas dos comparativas entre grupos individualizan ambas el efecto de la dieta. La comparativa entre grupos también deja patente el efecto beneficioso de abandonar una dieta con alto contenido en grasa para revertir la esteatosis hepática establecida, independientemente del tratamiento con melatonina, y así se comprueba también mediante el modelo de regresión lineal. Por lo tanto, no podemos atribuir a la melatonina un efecto sobre la mejora de la infiltración grasa del hígado

Cabe resaltar, aunque carezca de significación estadística, que el grupo 1 (continuación de la dieta y tratamiento con melatonina) ha aumentado la esteatosis mucho menos que el grupo 2 (continuación de la dieta sin tratamiento con melatonina), lo cual podría hacernos suponer que la melatonina ha tenido cierto efecto protector en la progresión de la enfermedad.

8.8.2. GRADO DE ESTEATOSIS ANALIZADO POR PROGRAMA DE TRATAMIENTO DE IMÁGENES

La tendencia en la variación media de esteatosis se mantiene en el análisis digital de imágenes igual que en el análisis por patólogo, con alguna variación en cuanto a significación estadística.

Los grupos 3 y 4 (animales que discontinuaron la dieta esteatósica) disminuyen el grado de esteatosis media de manera significativa ($p=0,043$ y $p=0,043$) en ambos grupos. De nuevo se puede concluir que el abandono de una dieta rica en grasas disminuye el grado de infiltración grasa del hígado. Respecto a los grupos 1 y 2 (animales que continúan con la dieta esteatósica) se observa que el grupo 2 (animales que continúan con la dieta y no toman melatonina), el porcentaje de esteatosis aumenta siendo este aumento significativo ($p=0,08$), a diferencia de lo que ocurre en el grupo 1 (animales que continúan con la dieta y toman melatonina), en el que el grado de esteatosis no aumenta, prácticamente se mantiene en el mismo valor.

En la comparativa por grupos observamos los mismos resultados que bajo visión directa por patólogo: existen diferencias significativas ($p=0,010$ y $p=0,003$) en cuanto a porcentaje de cambio de esteatosis al comparar los grupos 1-3 y 2-4. Esto hace referencia al efecto positivo del abandono de la dieta esteatósica sobre la reversión de la esteatosis hepática. Sin embargo, hemos obtenido significación estadística ($p=0,02$) en cuanto a porcentaje de cambio al comparar los grupos 1-2 (animales que han continuado con dieta esteatósica), lo cual indica un efecto positivo de la melatonina en cuanto a la reversión de la esteatosis. Esto refuerza nuestra hipótesis anterior, es decir, de los animales que continúan con la dieta esteatósica, aumentan menos la esteatosis los animales que toman melatonina. Podemos demostrar entonces un cierto efecto protector de la melatonina en la progresión de la enfermedad hepática (Fig.117 y Fig.118).

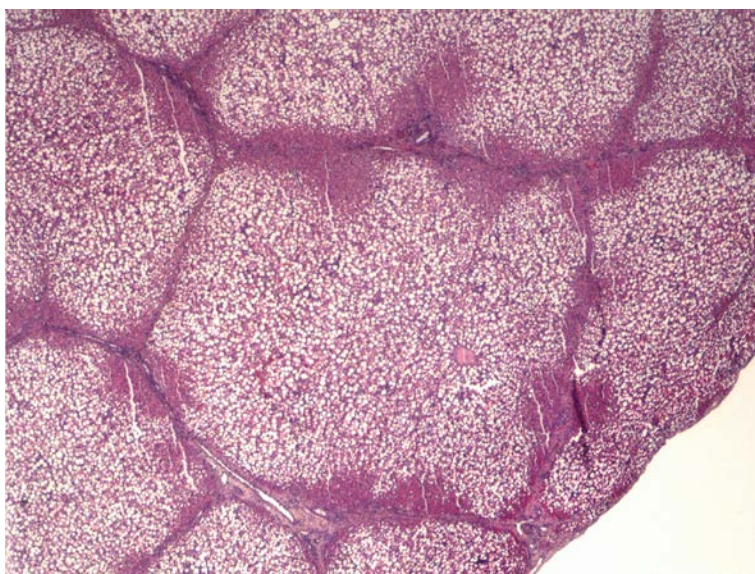


Fig.117. Animal del grupo 1 en la primera biopsia o tiempo pre, con un grado de esteatosis del 90% (HE 2x). Análisis realizado por patólogo.

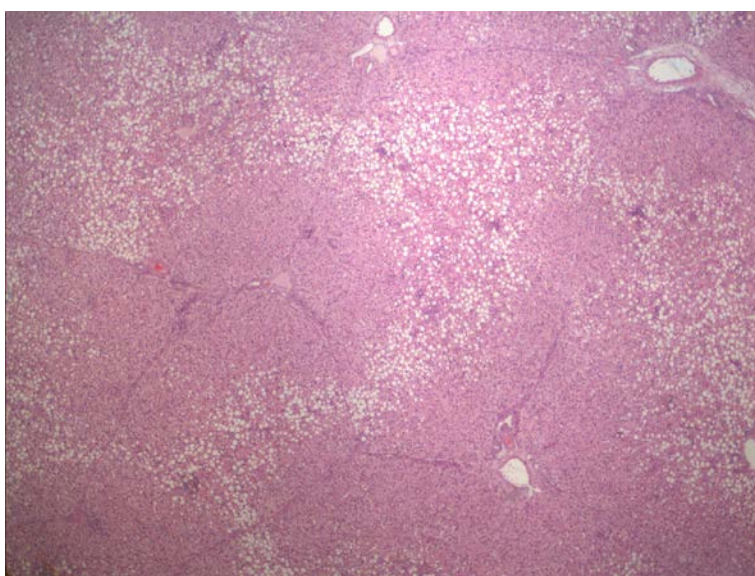


Fig.118. Mismo animal que en la imagen anterior, donde se aprecia la mejoría del grado de esteatosis, que es del 70% en esta segunda biopsia (HE 2x). Análisis realizado por patólogo.

En modelos experimentales de esteatosis inducidos por tóxicos¹⁷⁸ (tioacetamida, tetracloruro de carbono, dimetilnitrosamina, lipopolisacárido, ocratoxina A, metales pesados) o incluso por lesiones por isquemia-reperfusión²⁰³, ligadura del conducto biliar, pinealectomía²³², la melatonina ha demostrado capacidad de revertir el grado de infiltración grasa.

En el modelo murino de Pan et al.²¹² demostró que una dosis moderada o alta de melatonina (5 y 10 mg/kg/día) mejoró la esteatosis hepática en el sentido de que la mayor parte de las ratas tratadas con 5 mg/kg/ día de melatonina presentaron un grado de esteatosis de I y II, y las ratas tratadas con 10 mg/kg/día de melatonina presentaron mayoritariamente un grado I. Hay que mencionar de nuevo, que la diferencia del trabajo de Pan et al.²² respecto al nuestro es que, la melatonina se administró concomitantemente a la dieta alta en grasas, no posteriormente, por lo tanto la intención de este estudio es prevenir y no tratar la esteatosis hepática.

En el trabajo de Hatzis et al.²¹³ (2013) se estudió el efecto de la melatonina a dos niveles, como prevención de la esteatosis hepática (grupos de ratas a las que se administró dieta alta en grasas concomitantemente con melatonina) y como tratamiento de la esteatosis hepática instaurada (grupos de ratas a las que se administró dieta alta en grasas y en las últimas semanas se administró también melatonina). Esta es la única similitud con nuestro estudio que hemos encontrado en la literatura respecto a la reversión de la esteatosis hepática en un modelo experimental. Los autores de este estudio concluyen que existe una acción protectora de la melatonina cuando se administró de forma sincronizada con la dieta alta en grasas, este efecto no se demostró en las ratas que recibieron melatonina en una fase tardía del experimento. Este estudio es el primer estudio en modelo experimental que demostró la posible ineficacia de la melatonina para revertir la esteatosis hepática una vez establecida.

Para aportar algo de luz en la hipótesis de que la melatonina podría ser menos eficaz en la esteatosis ya instaurada, es decir, con un alto grado de infiltración grasa hepática, analizamos con los datos de nuestro estudio, si existe una relación entre el grado de esteatosis alcanzado y el porcentaje de cambio (coeficiente de correlación). Pues bien, en la medición del grado de esteatosis por patólogo, obtuvimos asociación fuerte negativa entre el grado de esteatosis alcanzado y el porcentaje de cambio para el grupo 1 y 2. En la medición del grado de esteatosis mediante análisis digital de imágenes, obtuvimos relación fuerte negativa sólo para el grupo 2. Lo cual quiere decir, que para estos grupos, a mayor esteatosis alcanzada, menor es el porcentaje de cambio. Este dato es interesante para el grupo 1 (animales que continuaron la dieta

esteatósica y se trataron con melatonina), ya que podría encajar con nuestra hipótesis de que a mayor esteatosis, la melatonina ejerce menor efecto en la mejoría del porcentaje de hepatocitos afectados.

En el modelo de Tahan et al.²¹⁶ también se demostró el efecto protector de la melatonina intraperitoneal a dosis de 50 mg/kg/día durante 4 semanas en la instauración de la esteatosis hepática a ratas alimentadas con dieta deficiente en metionina y colina (MCDD). La melatonina se administró de manera concomitante a la dieta rica en grasas.

Agil²¹⁷ demostró la reducción de la disfunción hepática mitocondrial en ratas obesas. La disfunción mitocondrial juega un papel muy importante en la resistencia insulínica y en el desarrollo de esteatosis hepática. Las ratas obesas y diabéticas tratadas con melatonina tuvieron una infiltración grasa del 15%, con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de ratas obesas y diabéticas no tratadas con melatonina. En este estudio se demostró también mejoría de la disfunción hepática mitocondrial, que juega un papel muy importante en el desarrollo de esteatosis hepática. Este estudio también tiene similitudes con el nuestro, ya que su objetivo es revertir un hígado graso ya instaurado (supuestamente) en ratas obesas, y consiguen demostrarlo. Como limitaciones de este estudio encontramos que establecen la mejoría del grado de esteatosis comparando el grupo de ratas obesas tratado con melatonina con el grupo de ratas obesas no tratadas con melatonina, es decir, no realizan biopsia para calcular la variabilidad intraindividual y saber del grado de esteatosis del que se parte.

Respecto a los estudios realizados en humanos, ninguno de ellos excepto el trabajo de Celinski et al.²²⁰ en 2014, realiza biopsia hepática tras el tratamiento con melatonina. En 23 pacientes con diagnóstico histológico de NASH, se administró un preparado de fosfolípidos y melatonina a dosis de 10 mg/kg/día/vía oral y realizó biopsia a 4 de estos pacientes. Tras el tratamiento con melatonina se observaron datos histológicos de esteatosis, pero no de inflamación. Las limitaciones de este estudio es el escaso número de sujetos al que se realizó la segunda biopsia, los resultados pueden estar sesgados por la escasa muestra. Además no se cuantificó el grado de esteatosis ni se establecieron los criterios por los cuales se realizó a esos sujetos una segunda biopsia.

8.8.3. GRADO DE ESTEATOSIS ANALIZADO POR PATÓLOGO VS GRADO DE ESTEATOSIS ANALIZADO POR PROGRAMA DE TRATAMIENTO DE IMÁGENES

La evaluación del grado de esteatosis hepática, el método tradicional que se utiliza en la mayor parte de los laboratorios clínicos del mundo, se realiza mediante valoración de la muestra histológica teñida con hematoxilina-eosina.

La técnica de medición se suele basar en el conteo de hepatocitos con vacuolas de grasa con la ayuda de una rejilla (fig. x), que se superpone a la muestra histológica. El número de celdillas ocupadas por hepatocitos esteatósicos en comparación con el total de la rejilla permite un mínimo de extrapolación a toda la muestra.

El inconveniente de este método es que se trata de un método totalmente subjetivo, que depende de la experiencia del médico patólogo, la preparación de la muestra, la tinción e incluso a las circunstancias del caso.

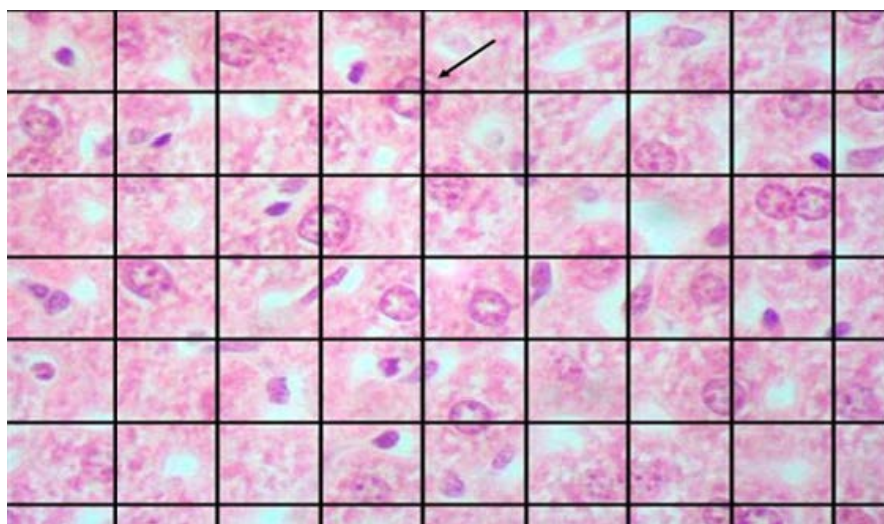


Fig.119. Rejilla sobrepuesta a la imagen microscópica para realizar el conteo de hepatocitos con vacuolas de grasa.

Con el fin de evitar dicha subjetividad, aumentar la precisión y permitir una homologación de los resultados, se han desarrollado diferentes técnicas para el análisis digital de imágenes histológicas. Estas técnicas incluyen procesamientos informáticos de las imágenes obtenidas de cortes histológicos de una muestra hepática.

Existen trabajos que indican que hay discrepancias en la valoración del grado de infiltración grasa entre observadores cuando los análisis son llevados a cabo por patólogos poco familiarizados con la patología hepática. Hall et al.¹⁰⁹ publicaron un trabajo en el que analizaron una serie de muestras hepáticas valoradas por varios patólogos de diversos centros y también por medios digitales. Aunque no existían muchas discrepancias a la hora de valorar el porcentaje de esteatosis, si existían grandes discrepancias a la hora de valorar otras lesiones y sobre todo los índices de concordancia con los resultados obtenidos mediante análisis digital de la muestra fueron bajos.

En nuestro estudio, un único patólogo con amplia experiencia en patología hepática analizó el total de las muestras. Además utilizamos un método de análisis digital de imagen mediante un programa informático, para evitar la posible subjetividad de la visión directa por patólogo.

El programa de evaluación de las imágenes es un software específico asistido por Mathlab® lo que nos permitió modificar el modo de gestión de los cortes histológicos para que la muestra fuera más representativa, analizando 4 fotografías obtenidas del mismo corte entorno a una vena centrolobulillar. El resultado en forma de porcentaje de la esteatosis obtenida fue muy homogéneo entre las cuatro muestras del mismo lobulillo, lo que nos da una idea de la idoneidad del método. Además nuestro programa de análisis de imagen permite obtener y analizar cuantas imágenes en torno a las venas centrolobulillares queramos (aumentando así la fiabilidad de la muestra).

Se ha publicado que el análisis convencional histológico de las biopsias hepáticas sobrevalora el grado de esteatosis real, comparado con los datos obtenidos por el análisis digital. Esta sobrevaloración es mayor en hígados con mayor grado de

esteatosis y ocurre incluso cuando la valoración se realiza no en porcentaje sino en categorías (de uno a cuatro grados).

Las categorías o grados para expresar la infiltración grasa que han sido recomendados por la Asociación Americana de Gastroenterología para la NAFLD, son los siguientes:

- Grado 0: < 5%
- Grado 1: 5-25%
- Grado 2: 25-50%
- Grado 3: 50-75%
- Grado 4: > 75%

En nuestro estudio, se observó que la medición de la esteatosis mediante análisis digital aporta en todos los casos unos valores medios inferiores a los obtenidos por visión directa del patólogo. De media el grado de esteatosis medida por visión directa del patólogo puntúa 40,68% más en el momento pre y 36,87% más en el momento post. En el tiempo pre el porcentaje máximo de media fue de 95% analizado por patólogo y 60% analizado por programa; y el mínimo fue de 40% analizado por patólogo y 16% analizado por programa. En el tiempo post el porcentaje máximo de media fue 100% analizado por patólogo y 60% analizado por programa; y el mínimo fue de 30% analizado por patólogo y 5% analizado por el programa. En conclusión, en nuestro estudio el análisis por patólogo sobreestima el grado de esteatosis.

Estudios publicados en la literatura corroboran esta sobreestimación. El estudio de Franzen et al.¹⁰⁸ muestra una discrepancia enorme entre el análisis convencional por patólogo y el análisis digital. Se encontraron grados de esteatosis entre el 0 y el 80% mediante análisis por patólogo y entre el 0 y el 15% mediante análisis digital.

Una explicación de esta sobreestimación, como explican diversos autores, es que el área medida de vacuolas grasas hepatocitarias, se mide mejor por métodos informáticos que puramente visuales, ya que el ordenador es capaz de eliminar las áreas de la muestra con similar aspecto visual (en el diseño de nuestro programa

informático tuvimos en cuenta este hecho) y la valoración subjetiva siempre tiende a evitar falsos negativos de esteatosis, aún a costa de un mayor número de falsos positivos.

En nuestro estudio, se observa un que existe una correlación débil positiva ($r=0,318$) entre la esteatosis pre analizada por patólogo y entre la esteatosis pre analizada digitalmente, aunque esta relación no es estadísticamente significativa ($p=0,082$). Sin embargo, la relación es estadísticamente significativa ($p<0,001$) entre ambos métodos para los valores post, con una relación fuerte positiva ($0,795$).

En conclusión, en nuestro estudio obtuvimos una alta correlación entre los valores obtenidos mediante análisis convencional por visión directa del patólogo y el análisis digital, tanto en el tiempo pre como en el tiempo post, pero con una sobreestimación del grado de esteatosis mediante el análisis por patólogo.

Nuestro método de análisis digital, diseñado por nuestro grupo de investigación, presenta una serie de ventajas con respecto a otros programas similares de análisis informático de imagen:

- En primer lugar analiza al menos cuatro muestras de la biopsia hepática y realiza una media de los datos de las mismas. Esto permite evitar las posibles variaciones en cuanto al grado de infiltración encontrado en la misma víscera, ya que la esteatosis puede acumularse en áreas específicas del hígado con otras áreas de aspecto histológico normal. Además permite analizar cuantas imágenes deseemos.
- Se selecciona siempre la zona centrada en una vena hepática centrolobulillar y se recogen datos de los cuatro cuadrantes alrededor de la misma, que es donde aparece de forma más temprana la esteatosis, a diferencia de trabajos sobre análisis de imagen que se realizan sobre muestras tru-cut hepático sin posibilidad de selección de una región histológica del hígado.
- Nuestro método es perfectamente reproducible ya que el observador sólo selecciona las imágenes a tratar, siendo la cuantificación totalmente objetiva.

Los inconvenientes que presenta nuestro programa de lectura digital, es común a la mayoría de programas informáticos destinados a este fin, son los siguientes:

- Está diseñado exclusivamente para valorar el grado de esteatosis y no es capaz de detectar otras alteraciones histológicas como la fibrosis, la balonización de los hepatocitos, las áreas de regeneración, etc.
- No cuantifica la esteatosis microvesicular, mucho más difícil de detectar y con mayor repercusión funcional que la propia esteatosis macrovesicular.

La determinación semicuantitativa de la esteatosis, ya sea por métodos convencionales o por métodos digitales, tiene dos limitaciones:

- La primera hace referencia a la tinción tradicionalmente empleada, la hematoxilina-eosina. El método rutinario de teñir y de procesar la muestra puede ocasionar que durante el proceso de tinción se pierdan gotas de lípidos y además, existan espacios en los hepatocitos (previamente ocupados por glucógeno), que durante el procesamiento son perdidos. Así pues, no todos los espacios observados con la tinción de H-E son inequívocamente espacios ocupados por gotas de grasa.
- Otra limitación es la valoración de la esteatosis en muestras planas de dos dimensiones, y no de forma tridimensional.

La valoración real de la cantidad de grasa debería ser una cuantificación bioquímica, lo cual incluiría una homogeneización de la muestra, extracción de las fracciones de lípidos y cuantificación real de los mismos, aunque esto conllevaría a la destrucción de la muestra, que no podría valorarse posteriormente de otra forma. La determinación directa de los triglicéridos y colesterol mediante el homogeneizado de la biopsia hepática debería ser el patrón estándar para medir la esteatosis.

Li et al.²⁰ compararon la medición tradicional con la medición mediante un programa de tratamiento de imágenes y una cuantificación directa bioquímica. Se trata de uno de los pocos trabajos que comparan los tres métodos. Obtienen una correlación significativa entre los tres modelos. Indican la superioridad del método de cuantificación bioquímica aunque también señalan los inconvenientes de cada uno:

- Mayor subjetividad y baja reproductibilidad para el método de análisis tradicional.
- Necesidad de un software especial y análisis de muestras en dos dimensiones para el método de análisis digital.
- Sacrificio de toda la muestra histológica en el método de cuantificación bioquímica.

8.9. MEDICIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO: MDA Y CARBONILOS

El efecto beneficioso de la melatonina sobre el metabolismo lipídico y la NAFLD es la disminución de la peroxidación lipídica y la limitación o prevención del estrés oxidativo, principales mecanismos fisiopatogénicos de dicha patología. Las acciones antioxidantes de la melatonina incluyen:

- Estimulación de enzimas antioxidantes.
- Regulación de la transcripción de genes para las enzimas antioxidantes.
- Eliminación directa de radicales libres.
- Reducción de la generación de radicales libres.
- Acción sobre la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial.

Durante el estrés oxidativo, los lípidos son las moléculas más susceptibles de ser atacados por radicales libres. El ataque oxidativo a los lípidos o peroxidación lipídica comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno y se forma un radical alquílico. Un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de peroxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal.

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobretodo por el radical hidroxilo. En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina,

se oxidan dando lugar a grupos carbonilos, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas.

Existe evidencia de que la melatonina ejerce una función protectora en diferentes sistemas experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*^{237,238}.

El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas. La melatonina también ha demostrado reducir el efecto inducido por radicales libres en la alteración de la fluidez de la membrana microsomal¹⁷⁶.

En la mayoría de trabajos experimentales en modelo animal y estudios clínicos en humanos que han estudiado el efecto de la melatonina en la prevención de la esteatosis hepática han realizado la determinación de algún parámetro de estrés oxidativo para reflejar el mecanismo de daño celular que acontece en NAFLD. El parámetro más utilizado es MDA. También se han determinado los niveles de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico, los niveles de enzimas antioxidantes y la fluidez de la membrana citoplasmática. En nuestro estudio consideramos la determinación de los niveles de MDA y carbonilos, por ser los productos mayoritarios de degradación de lípidos y proteínas.

Encontramos que los niveles medios basales de MDA en el grupo control fueron muy inferiores a los niveles medios de MDA en los animales que concluyeron la dieta esteatósica (0,77 vs 1,69 respectivamente) por lo tanto asumimos que la dieta esteatósica generó el efecto esperado en los animales, generando un daño oxidativo celular.

Los resultados que obtuvimos en cuanto a MDA es que su valor medio experimentó un descenso en el tiempo post con respecto al pre, en todos los grupos, siendo este descenso únicamente significativo en el grupo 1 ($p=0,004$), es decir, en el grupo de animales que mantuvieron la dieta esteatósica y fueron tratados con melatonina. Esto significa que los animales que tomaron melatonina, a pesar de continuar con la dieta esteatósica redujeron significativamente su nivel medio de MDA. Sin embargo la

comparativa entre los grupos 1-2, que individualiza el efecto de la melatonina (animales que continuaron la dieta esteatósica), no revela diferencias significativas. Tampoco existen diferencias en la comparativa entre el resto de grupos, por lo que no podemos concluir que la dieta genere un efecto en la variación media de MDA, al contrario de lo que cabría esperar al cesar el estímulo que genera la peroxidación lipídica como es el aporte exógeno de grasas.

Los carbonilos en el grupo 1 (animales que continuaron con la dieta esteatósica y fueron tratados con melatonina) disminuyeron su valor medio, aunque esta disminución no fue significativa, sin embargo este grupo fue el único que experimentó un descenso, ya que en el resto de grupos el valor medio de carbonilos aumentó, incluso siendo este aumento significativo en el grupo 4 ($p=0,028$). Esta diferencia entre el grupo 1 y el grupo 2 (grupo de animales que mantiene dieta esteatósica pero no se trata con melatonina) genera una significación estadística entre los grupos ($p=0,014$). Esta comparativa individualiza el efecto de la melatonina, por lo tanto podemos concluir que la melatonina ejerce un efecto en la variación del valor medio de carbonilos en los animales que han mantenido dieta esteatósica.

Nuestros resultados coinciden con los modelos experimentales recientes realizados en roedor, a los que se administró dieta alta en grasas y tratamiento con melatonina con el objetivo de prevenir la instauración de la esteatosis hepática.

Pan et al.²¹² demostraron que la melatonina a dosis de 10 mg/kg/día durante 12 días vía intraperitoneal redujo los niveles de MDA en el hígado y aumentó los niveles de enzimas antioxidantes a dosis de 2.5, 5 y 10 mg/kg/día.

En el estudio similar realizado por Hatzis et al.²¹³ también se pudo demostrar que la melatonina atenuaba el estrés oxidativo, disminuyendo los niveles de MDA y aumentando los niveles de glutatión significativamente en el grupo de ratas tratadas con melatonina respecto a las ratas no tratadas.

Hoyos et al.²¹⁴ demostraron una disminución de MDA+4-HDA en hígado en las ratas sometidas a dieta rica en colesterol y tratadas con melatonina vía oral a dosis de 10 mg/L en el agua de bebida.

En el estudio de Tahan et al.²¹⁶ también observaron una disminución de los niveles de MDA en el grupo de ratas alimentadas con dieta deficiente en metionina y colina y tratadas con melatonina a dosis de 50 mg/kg/día vía intraperitoneal durante 1 mes, con respecto al grupo de ratas alimentadas solo con dieta deficiente en metionina y colina.

Subramanian et al.²¹⁸ determinaron las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico y las enzimas antioxidantes como parámetros de medición de estrés oxidativo en ratas alimentadas mediante dieta regular y a las que se administró melatonina a dosis de 0,5 y mg/kg/día vía intraperitoneal. Observaron un descenso de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico y un aumento de enzimas de estrés oxidativo en el grupo de ratas alimentados mediante dieta regular y tratados con melatonina a ambas dosis en comparación con el grupo control.

El grupo de Atilgan et al.²¹⁹ en 2013 publicó un trabajo en el que evaluaban la modificación de los parámetros de estrés oxidativo en ratas alimentadas con dieta alta en grasas, sometidas a discontinuación de la dieta o a melatonina. Evaluaron los efectos antioxidantes producidos por la melatonina y la pérdida de peso en ratas con obesidad inducida, analizando dichos parámetros en suero y en testículos. La pérdida de peso y el tratamiento con melatonina mejoraron significativamente los niveles de MDA, carbonilos y SOD en el tejido testicular y el suero.

En los ensayos clínicos realizados en humanos, no se realizaron determinaciones de parámetros de estrés oxidativo, por lo tanto no podemos realizar comparaciones.

En conclusión obtenemos resultados esperanzadores en cuanto a la mejoría de los marcadores de estrés oxidativo que tienen lugar a nivel celular, cuando iniciamos tratamiento con melatonina en animales con una esteatosis instaurada e inducida por dieta.

8.10. CONCLUSIONES GENERALES

Como conclusiones generales de nuestro trabajo, podemos decir que no hemos podido demostrar a nivel global un efecto beneficioso de la melatonina en la mejoría o reversión de la esteatosis hepática una vez instaurada, inducida por dieta en un modelo animal porcino. No hemos conseguido demostrar el efecto hipolipemiante y citoprotector a nivel hepático de la melatonina, a diferencia de los resultados obtenidos en la literatura en estudios experimentales y en estudios clínicos en humanos. Sin embargo, aunque no hemos obtenido resultados contundentes sobre un efecto beneficioso de la melatonina, hemos encontrado diversos indicios de mejoría a nivel histológico y a nivel de los parámetros de estrés oxidativo. Hemos comprobado en nuestro estudio que, en el análisis histológico de la muestra hepática mediante programa de tratamiento de imágenes (libre de subjetividad), de los animales que continúan con la dieta, los que no consumen melatonina no aumentan de media la esteatosis tanto como los que no la consumen, de manera significativa ($p=0,002$). En cuanto a los parámetros de estrés oxidativo, el MDA disminuye de manera significativa en el grupo de animales que continúan con la dieta y toman melatonina, aunque no existen diferencias significativas en cuanto a porcentaje de cambio al comparar por grupos. En cuanto a Carbonilos, observamos que de los animales que continúan con la dieta esteatósica, el nivel de carbonilos desciende de manera significativa en los animales tratados con melatonina con respecto a los no tratados ($p=0,014$).

Si bien es cierto que estos indicios de mejoría de la melatonina a nivel histológico y a nivel de estrés oxidativo, son resultados positivos, ya que nuestro estudio es el primer estudio trabajo realizado en un modelo de grandes animales en el que se estudia el efecto de la melatonina como tratamiento en la reversión de la esteatosis hepática instaurada. Hasta ahora todos los modelos experimentales se realizaban con roedores y la gran mayoría probando la melatonina como prevención de la esteatosis hepática. Sólo en el estudio de Hatzis encontramos similitudes con nuestro estudio, ya que en un grupo de roedores se administró dieta esteatósica durante 8 o 12 semanas y en las últimas 4 semanas se administró melatonina vía intraperitoneal. Los autores de este

estudio concluyen que en este grupo de roedores no existe ningún efecto protector de la melatonina en una fase tardía, por lo tanto, es la primera vez que en la literatura se hace referencia a que la melatonina no podría ser eficaz ante la enfermedad hepática ya instaurada.

Los estudios realizados en humanos tienen el hándicap de que no realizan biopsias para corroborar la mejoría de la esteatosis hepática tras la administración de melatonina, probablemente por el porcentaje de complicaciones no desdeñable que conlleva este método diagnóstico.

Con este trabajo podemos demostrar cierto efecto protector de la melatonina en cuanto a menor progresión de la esteatosis en la muestra histológica, sin embargo no podemos demostrar la mejoría, como en otros estudios. Podemos sacar varias reflexiones al respecto.

La primera, a la cual ya se ha hecho referencia, es que en nuestro trabajo partimos de niveles de esteatosis muy elevados. Los estudios experimentales en roedores administran la melatonina de manera concomitante con la dieta rica en grasas, por lo que pretenden encontrar un efecto protector de la melatonina en la instauración de la esteatosis hepática, no la reversión de la esteatosis hepática, que es el objetivo de nuestro estudio. Por otra parte, en los estudios realizados en humanos el grado de esteatosis del que se parte no llega a los niveles tan elevados de esteatosis de los que partimos nosotros. Por lo tanto es posible que la melatonina tenga un efecto preventivo de la lesión hepática o incluso sirva como tratamiento de la esteatosis hepática cuando el grado de afectación grasa de los hepatocitos es menor, siendo difícil su reversión cuando la afectación hepatocitaria es mayoritaria y no cesa el estímulo que la produjo.

Otro aspecto a tener en cuenta es el tiempo de administración de melatonina. Hemos visto que en nuestro estudio se obtienen resultados positivos a nivel molecular, en el mecanismo íntimo de producción de NAFLD, es decir, observamos que la melatonina atenúa el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica en los grupos de animales que continúan con la dieta, sin embargo los cambios a nivel histológico han sido solo de

prevenir la progresión. Esto puede ser debido a que el período de administración de melatonina (4 semanas) o la dosis administrada (10 mg/kg/día) es insuficiente para observar cambios en la acumulación de lípidos hepatocitarios a nivel histológico. Se necesitarían estudios con un tiempo de administración más prolongado de melatonina o con una dosis mayor para demostrar este efecto.

8.11. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

A la hora del análisis de los datos nos encontramos principalmente con dos problemas estadísticos habituales. En primer lugar tamaño muestral y potencia de la prueba. Emplear muestras pequeñas, como es común en los estudios de experimentación con animales de gran tamaño, conlleva una pérdida de potencia en los contrastes de hipótesis, tal y como explica la publicación de Button et al. en *Nature Reviews Neuroscience* de 2013. Al aumentar el tamaño de la muestra dejando fijos los demás elementos, aumentaría también la potencia de la prueba. Esto es, con una muestra grande es más probable detectar diferencias significativas entre los grupos cuando realmente éstas existen. En nuestro proyecto, todos los grupos alcanzan el tamaño muestral óptimo estimado en los cálculos previos, pero un tamaño superior mejoraría la potencia del estudio.

En segundo lugar debemos hablar de las comparaciones múltiples. Cuando el número posible de comparaciones es elevado, la aplicación reiterada de este procedimiento para un nivel de significación dado, puede conducir a un alto número de rechazos de la hipótesis nula aunque no existan diferencias reales. En nuestro estudio, se da esta situación cuando se comparan los resultados entre los cuatro grupos de animales. Aplicando la corrección de Bonferroni podríamos paliar el problema, en nuestro caso supondría aceptar como estadísticamente significativa una diferencia con un p valor menor que 0,0125 en lugar de 0,05 ya que evaluamos cuatro comparaciones. Sin embargo, no lo aplicamos ya que se trata de un método muy restrictivo y asumimos que las comparaciones entre los grupos son resultados secundarios, las conclusiones reales sobre el efecto de la dieta y el tratamiento se basan principalmente en los modelos de regresión lineal múltiple realizados.

Otra de las limitaciones fue que no realizamos una determinación de los niveles de melatonina en sangre, lo cual no nos permitió comprobar el efecto real del fármaco, aunque el efecto encontrado en las variaciones del MDA y carbonilos hace pensar que el fármaco fue ingerido por el animal y fue metabolizado de forma correcta.

Tampoco realizamos un grupo de estudio para valorar el efecto del fármaco como prevención de la NAFLD, es decir administrar la melatonina a la vez que la dieta esteatósica, como realizan una gran mayoría de autores, aunque este no fue nuestro propósito.

8.12. FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Creemos que una de las mayores fortalezas de nuestro estudio fue el modelo experimental empleado, original de nuestro grupo y experimentado en otros trabajos. Nuestro grupo ha realizado experiencias utilizando este modelo en más de 70 animales, con resultados uniformes en cuanto a la producción de NAFLD. Además en nuestro modelo hemos demostrado que acontecen todos los fenómenos que contribuyen a la NASH. Cambios estructurales hepáticos desde la simple acumulación de lípidos en los hepatocitos a la producción de fibrosis, así como cambios generales bioquímicos y serológicos.

Otra de las fortalezas de nuestro estudio es el que intentamos individualizar el efecto de la Melatonina del efecto de la ingesta de la dieta esteatósica. Muchos de los trabajos no incluyen grupos con discontinuación de la dieta o buscan puramente el efecto protector del fármaco administrándolo conjuntamente con la dieta. En nuestro trabajo preferimos utilizar 4 grupos distintos de animales, lo cual nos obligó a emplear una cantidad de animales de experimentación considerable pero permitió simular los diferentes escenarios en los que se puede administrar la melatonina como fármaco para tratar la NAFLD.

También el estudio de la esteatosis por medio del análisis de imagen por ordenador supone una menor variabilidad comparada con la valoración que realiza el patólogo, aunque los resultados que obtuvimos con el análisis de imagen fueron similares a los obtenidos por visión directa del patólogo.

9. CONCLUSIONES

1. Nuestro modelo experimental de esteatosis en grandes animales basado en modificaciones de la dieta, es capaz de provocar cambios histológicos hepáticos similares a la NAFLD con grados de infiltración grasa por encima del 40% tras 3 meses de dieta.
2. La medición del grado de infiltración grasa del hígado estimada subjetivamente por el patólogo magnifica el porcentaje de esteatosis comparado con el método de medición realizado con ayuda de un programa informático de tratamiento de imágenes.
3. La melatonina administrada vía oral en una sola toma a dosis de 10 mg/kg/día durante 4 semanas es incapaz de revertir la esteatosis hepática en un modelo de hígado graso porcino con elevados grados de infiltración.
4. La melatonina administrada vía oral en una sola toma a dosis de 10 mg/kg/día durante 4 semanas es incapaz de modificar los niveles de lípidos plasmáticos ni los parámetros serológicos de daño hepático provocados por la dieta inductora de esteatosis.
5. La melatonina administrada vía oral en una sola toma a dosis de 10 mg/kg/día durante 4 semanas produce un efecto de disminución de la peroxidación lipídica medido mediante la disminución de los malondialdehído (mayor que los casos en los que no se tome el fármaco, aunque estos resultados no son estadísticamente significativos) y medido mediante la disminución de los Carbonilos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Persico M, Iolascon A. Steatosis as a co-factor in chronic liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2010;16(10):1171-1176.
2. Rinella ME. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Jama*. 2015;313(22):2263.
3. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: From steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2 SUPPL. 1):99-112.
4. Kneeman JM, Misdraji J, Corey KE. Secondary causes of nonalcoholic fatty liver disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2012;5(3):199-207.
5. Wei Y, Rector RS, Thyfault JP, Ibdah JA. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. *World J Gastroenterol*. 2008;14(2):193-199.
6. Craemer D De, Pauwels M, Branden C Van den. Alterations of peroxisomes in steatosis of the human liver: A quantitative study. *Hepatology*. 1995;22(3):744-752.
7. Jansen PLM. Nonalcoholic steatohepatitis. *Liver*. 2004;62(7):217-224.
8. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Qjm*. 2010;103(2):71-83.
9. James OFW, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol*. 2017;29(3):495-501.
10. Day CP. From fat to inflammation. *Gastroenterology*. 2006;130(1):207-210.
11. Costas M, Costas M, Age RM, P-h C, Diseases I. Steatohepatitis: A Tale of Two “Hits”? *Gastroenterology*. 1995;114(4):842-845.
12. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest*. 2008;118(3):829-838.
13. Hudgins LC, Hellerstein MK, Seidman CE, Neese R a, Tremaroli JD, Hirsch J. Relationship between carbohydrate-induced hypertriglyceridemia and fatty acid synthesis in lean and obese subjects. *J Lipid Res*. 2000;41(4):595-604.

14. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-?? or adiponectin? *Hepatology*. 2004;40(1):46-54.
15. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K, Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23(2):201-229.
16. Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2002;35(4):898-904.
17. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1343-1351.
18. van der Poorten D, Milner KL, Hui J, et al. Visceral fat: A key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology*. 2008;48(2):449-457.
19. Pessayre D. Role of mitochondria in non alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(s1):S20-S27.
20. Kang P, Liao M, Wester MR, Leeder JS, Pearce RE. NIH Public Access. *Ratio*. 2010;36(3):490-499.
21. Giuseppe Matarese M, Moschos S, Matarese G, Mantzoros CS. Leptin in Immunology Leptin in Immunology 1. *J Immunol Ref*. 2005;174:3137-3142.
22. Brennan AM, Mantzoros CS. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology emerging clinical applications. *Nat Clin Pr End Met*. 2006;2(6):318-327.
23. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;13(2):84-89.
24. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307-312.
25. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol*. 2017;37(1):56-62.
26. Yesilova Z, Yaman H, Oktenli C, et al. Systemic Markers of Lipid Peroxidation

- and Antioxidants in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(4):850-855.
27. Chalasani N, Deeg MA, Crabb DW. Systemic Levels of Lipid Peroxidation and Its Metabolic and Dietary Correlates in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(8):1497-1502.
 28. Petta S, Muratore C, Craxì A. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis : The present and the future. *Dig Liver Dis*. 2009;41:615-625.
 29. Begrich K, Igoudjil A, Pessayre D, Fromenty B. Mitochondrial dysfunction in NASH: Causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion*. 2006;6(1):1-28.
 30. Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest*. 2002;110(10):1383-1388.
 31. Cope K, Risby T, Diehl AMAE. Increased Gastrointestinal Ethanol Production in Obese Mice : Implications for Fatty Liver Disease Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2000:1340-1347.
 32. Solga SF, Diehl AM. Non-alcoholic fatty liver disease : lumen – liver interactions and possible role for probiotics. *J Hepatol*. 2003;38:681-687. doi:10.1016/S0.
 33. Esposito E, Iacono A, et al. Probiotics Reduce the Inflammatory Response Induced by a High-Fat Diet in the Liver of Young rats. *J Nutr*. 2009:0-6.
 34. Iver L, Ancreas P, Loguercio C, et al. Beneficial Effects of Probiotic VSL 3 on Parameters of Liver Dysfunction in Chronic Liver Diseases. *The Journal of Nutrition and Disease*. 2005;39(6):540-543.
 35. Rockall AG, Sohaib SA, Evans D, et al. Hepatic steatosis in Cushing ' s syndrome : a radiological assessment using computed tomography. *Eur J Endocrinol*. 2003:543-548.
 36. Nelson JE, Klintworth H, Kowdley K V. Iron Metabolism in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2012;14(1):8-16.
 37. Anstee QM, Day CP. The genetics of NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(11):645-655.

38. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, et al. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Gastroenterological Association, American Association for the Study of Liver Diseases, and American College of Gastroenterology. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(6):811-826.
39. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al. Chronological development of elevated aminotransferases in a nonalcoholic population. *Hepatology*. 2005;41(1):64-71. doi:10.1002/hep.20543.
40. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med*. 2005;143(10):722-728.
41. Whalley S, Puvanachandra P, Desai A, Kennedy H. Hepatology outpatient service provision in secondary care: a study of liver disease incidence and resource costs. *Clin Med*. 2007;7(2):119-124.
42. Marcos A, Fisher RA, Ham JM, et al. Selection and Outcome of Living Donors for Adult to Adult Right Lobe Transplantation. *Transplantation*. 2000;69(11).
43. Lee JY, Kim KM, Lee SG, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in potential living liver donors in Korea: A review of 589 consecutive liver biopsies in a single center. *J Hepatol*. 2017;47(2):239-244.
44. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: The epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;34(3):274-285.
45. Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: A prospective study. *Gastroenterology*. 2011;140(1):124-131.
46. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: Impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004;40(6):1387-1395.
47. Boza C, Riquelme A, Ibañez L, et al. Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis

- (NASH) in Obese Patients Undergoing Gastric Bypass. *Obes Surg*. 2005;15(8):1148-1153.
48. Haentjens P, Massaad D, Reynaert H, et al. Identifying non-alcoholic fatty liver disease among asymptomatic overweight and obese individuals by clinical and biochemical characteristics. *Acta Clin Belg*. 2009;64(6):483-493.
49. Machado M, Marques-Vidal P, Cortez-Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol*. 2017;45(4):600-606.
50. Beymer C. Prevalence and Predictors of Asymptomatic Liver Disease in Patients Undergoing Gastric Bypass Surgery. *Arch Surg*. 2015;138.
51. Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA, Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int*. 2009;29(1):113-119.
52. Schwimmer JB, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C, Behling C. Prevalence of Fatty Liver in Children and Adolescents. *Pediatrics*. 2006;118(4):1388.LP-1393.
53. Chen Z, Chen L, Dai H, Chen J, Fang L. Relationship between alanine aminotransferase levels and metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2008;9(8):616-622.
54. Stepanova M, Rafiq N, Younossi ZM. Components of metabolic syndrome are independent predictors of mortality in patients with chronic liver disease: a population-based study. *Gut* . 2010;59(10):1410-1415.
55. Dam-Larsen S, Franzmann M, Andersen IB, et al. Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death. *Gut*. 2004;53(5):750-755.
56. Dunn W, Xu R, Wingard DDL, et al. Suspected nonalcoholic fatty liver disease and mortality risk in a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(9):2263-2271.
57. Rafiq N, Bai C, Fang Y, et al. Long-Term Follow-Up of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009;7(2):234-238.
58. Dam-Larsen S, Becker U, Franzmann M-B, Larsen K, Christoffersen P, Bendtsen

- F. Final results of a long-term, clinical follow-up in fatty liver patients. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(10):1236-1243.
59. Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Deterioration of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transplant Proc.* 2017;29(1):412-415.
60. Hui A, Kawasaki S, Makuuchi M, Nakayama J, Ikegami T, Miyagawa S. Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver. *Hepatology.* 1994;20(5):1287-1293.
61. Veteläinen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM. Steatosis as a Risk Factor in Liver Surgery. *Ann Surg.* 2007;245(1).
62. Angulo P. Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *N Engl J Med.* 2002;346(16):1221-1231.
63. Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: A longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol.* 2005;42(1):132-138.
64. Barba E. Esteatosis hepática, esteatohepatitis y marcadores de lesión hepática. *NewMedigraphicCom.* 2008;55:216-232.
65. Spengler EK, Loomba R. Recommendations for Diagnosis, Referral for Liver Biopsy, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis. *Mayo Clin Proc.* 2015;90(9):1233-1246.
66. Abd El-Kader SM, El-Den Ashmawy EMS. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J Hepatol.* 2015;7(6):846-858.
67. Cusi K, Chang Z, Harrison S, et al. Limited value of plasma cytokeratin-18 as a biomarker for NASH and fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2017;60(1):167-174.
68. Shen J, Chan HL-Y, Wong GL-H, et al. Assessment of non-alcoholic fatty liver disease using serum total cell death and apoptosis markers. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;36(11-12):1057-1066.

69. Joka D, Wahl K, Moeller S, et al. Prospective biopsy-controlled evaluation of cell death biomarkers for prediction of liver fibrosis and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2012;55(2):455-464.
70. Dushay J, Chui PC, Gopalakrishnan GS, et al. Increased Fibroblast Growth Factor 21 in Obesity and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2017;139(2):456-463.
71. Li H, Dong K, Fang Q, et al. High serum level of fibroblast growth factor 21 is an independent predictor of non-alcoholic fatty liver disease: A 3-year prospective study in China. *J Hepatol*. 2017;58(3):557-563.
72. Li H, Fang Q, Gao F, et al. Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *J Hepatol*. 2017;53(5):934-940.
73. Shen J, Chan HL-Y, Wong GL-H, et al. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis by combined serum biomarkers. *J Hepatol*. 2017;56(6):1363-1370.
74. Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol*. 2006;6:33.
75. Bedogni G, Kahn HS, Bellentani S, Tiribelli C. A simple index of lipid overaccumulation is a good marker of liver steatosis. *BMC Gastroenterol*. 2010;10:98.
76. Lee J-H, Kim D, Kim HJ, et al. Hepatic steatosis index: A simple screening tool reflecting nonalcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis*. 2017;42(7):503-508.
77. Guiu B, Crevisy-Girod E, Biquet C, et al. Prediction for steatosis in type-2 diabetes: clinico-biological markers versus 1H-MR spectroscopy. *Eur Radiol*. 2012;22(4):855-863.
78. Harrison SA, Oliver D, Arnold HL, Gogia S, Neuschwander-Tetri BA. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut*. 2008;57(10):1441-1447.
79. Raszeja-Wyszomirska J, Szymanik B, Ławniczak M, et al. Validation of the

- BARD scoring system in Polish patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *BMC Gastroenterol.* 2010;10(1):67.
80. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology.* 2007;45(4):846-854.
81. McPherson S, Stewart SF, Henderson E, Burt AD, Day CP. Simple non-invasive fibrosis scoring systems can reliably exclude advanced fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2010;59(9):1265-1269.
82. Dasarathy S, Dasarathy J, Khiyami A, Joseph R, Lopez R, McCullough AJ. Validity of real time ultrasound in the diagnosis of hepatic steatosis: A prospective study. *J Hepatol.* 2017;51(6):1061-1067.
83. Papagianni M, Sofogianni A, Tziomalos K. Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2015;7(4):638-648.
84. Hernaez R, Lazo M, Bonekamp S, et al. Diagnostic accuracy and reliability of ultrasonography for the detection of fatty liver: A meta-analysis. *Hepatology.* 2011;54(3):1082-1090.
85. Joy D, Thava VR, Scott BB. Diagnosis of fatty liver disease: is biopsy necessary? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15(5).
86. Lee SS, Park SH, Kim HJ, et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis: Prospective comparison of the accuracy of imaging examinations. *J Hepatol.* 2017;52(4):579-585.
87. Iwasaki M, Takada Y, Hayashi M, et al. Noninvasive Evaluation of Graft Steatosis in Living Donor Liver Transplantation. *Transplantation.* 2004;78(10).
88. Kalra N, Duseja A, Das A, et al. Artemisa Chemical shift magnetic resonance imaging is helpful in detecting hepatic steatosis but not fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Magn Reson Imaging.* 2009;(November 2008).
89. Hatta T, Fujinaga Y, Kadoya M, et al. Accurate and simple method for quantification of hepatic fat content using magnetic resonance imaging: a

- prospective study in biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2010;45(12):1263-1271.
90. Noworolski SM, Lam MM, Merriman RB, Ferrell L, Qayyum A. Liver steatosis: concordance of MR imaging and MR spectroscopic data with histologic grade. *Radiology*. 2012;264(1):88-96.
91. McPherson S, Jonsson JR, Cowin GJ, et al. Magnetic resonance imaging and spectroscopy accurately estimate the severity of steatosis provided the stage of fibrosis is considered. *J Hepatol*. 2017;51(2):389-397.
92. Karlas T, Petroff D, Garnov N, et al. Non-invasive assessment of hepatic steatosis in patients with NAFLD using controlled attenuation parameter and 1H-MR spectroscopy. *PLoS One*. 2014;9(3).
93. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph J-M, et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol*. 2017;29(12):1705-1713.
94. Castéra L, Foucher J, Bernard PH, et al. Pitfalls of liver stiffness measurement: A 5-year prospective study of 13,369 examinations. *Hepatology*. 2010;51(3):828-835.
95. Gaia S, Carenzi S, Barilli AL, et al. Reliability of transient elastography for the detection of fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and chronic viral hepatitis. *J Hepatol*. 2017;54(1):64-71.
96. Wong VWS, Vergniol J, Wong GLH, et al. Diagnosis of fibrosis and cirrhosis using liver stiffness measurement in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(2):454-462.
97. de Lédinghen V, Vergniol J, Foucher J, El-Hajbi F, Merrouche W, Rigalleau V. Feasibility of liver transient elastography with FibroScan using a new probe for obese patients. *Liver Int*. 2010;30(7):1043-1048.
98. Wedemeyer H, Thursz M. The role of different EASL-papers: Clinical practice guidelines vs. position papers vs. conference summaries. *J Hepatol*. 2010;53(2):372-384.
99. Skelly MM, James PD, Ryder SD. Findings on liver biopsy to investigate

- abnormal liver function tests in the absence of diagnostic serology. *J Hepatol.* 2017;35(2):195-199.
100. Gaidos JKJ, Hillner BE, Sanyal AJ. A decision analysis study of the value of a liver biopsy in nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int.* 2008;28(5):650-658.
 101. Nalbantoglu ILK, Brunt EM. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(27):9026-9037.
 102. Thampanitchawong P, Piratvisuth T. Liver biopsy: complications and risk factors. *World J Gastroenterol.* 1999;5(4):301-304.
 103. Ratzu V, Charlotte F, Heurtier A, et al. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2005;128(7):1898-1906.
 104. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2005;41(6):1313-1321.
 105. Sakamoto M, Tsujikawa H, Effendi K, Ojima H, Harada K, Zen Y. Pathological findings of nonalcoholic steatohepatitis and nonalcoholic fatty liver disease. 2017:1-7.
 106. Brunt EM, Tiniakos DG. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2010;16(42):5286-5296.
 107. Turlin B, Ramm GA, Purdie DM, et al. Assessment of hepatic steatosis: comparison of quantitative and semiquantitative methods in 108 liver biopsies. *Liver Int.* 2009;29(4):530-535.
 108. Franzén LE, Ekstedt M, Kechagias S, Bodin L. Semiquantitative evaluation overestimates the degree of steatosis in liver biopsies: a comparison to stereological point counting. *Mod Pathol.* 2005;18(7):912-916.
 109. Hall AR, Dhillon AP, Green AC, et al. Hepatic steatosis estimated microscopically versus digital image analysis. *Liver Int.* 2013;33(6):926-935.
 110. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: A proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(9):2467-2474.

111. Wands JR, Fava J, Wing RR. Randomized Controlled Trial Testing the Effects of Weight Loss on Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). 2011;51(1):121-129.
112. Milic S, Mikolasevic I, Krznaric-Zrnic I, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Emerging targeted therapies to optimize treatment options. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:4835-4845.
113. Abenavoli L, Milic N, Peta V, Alfieri F, De Lorenzo A, Bellentani S. Alimentary regimen in non-alcoholic fatty liver disease: Mediterranean diet. *World J Gastroenterol.* 2014;20(45):16831-16840.
114. Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T, et al. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2017;59(1):138-143.
115. Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos JA, Panagiotakos DB. The effect of mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: A meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(11):1299-1313.
116. Jin R, Welsh JA, Le NA, et al. Dietary fructose reduction improves markers of cardiovascular disease risk in Hispanic-American adolescents with NAFLD. *Nutrients.* 2014;6(8):3187-3201.
117. Fructose I, Is C, With A, Severity F, Patients IN, Nafld W. NIH Public Access. 2011;51(6):1961-1971.
118. Malaguarnera M, Vacante M, Antic T, et al. Bifidobacterium longum with Fructo-Oligosaccharides in Patients with Non Alcoholic Steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* 2012;57(2):545-553.
119. Baran B, Aky??z F. Non-alcoholic fatty liver disease: What has changed in the treatment since the beginning? *World J Gastroenterol.* 2014;20(39):14219-14229.
120. Schwenger KJP, Allard JP. Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(7):1712-1723.
121. Hallsworth K, Fattakhova G, Hollingsworth KG, et al. Resistance exercise reduces liver fat and its mediators in non-alcoholic fatty liver disease independent

- of weight loss. *Gut*. 2011;60(9):1278-1283.
122. Thoma C, Day CP, Trenell MI. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: A systematic review. *J Hepatol*. 2017;56(1):255-266.
 123. Shojaee-Moradie F, Baynes KC, Pentecost C, et al. Exercise training reduces fatty acid availability and improves the insulin sensitivity of glucose metabolism. *Diabetologia*. 2007;50(2):404-413.
 124. Watanabe S, Hashimoto E, Ikejima K, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol*. 2015;50(4):364-377.
 125. Takahashi Y, Sugimoto K, Inui H, Fukusato T. Current pharmacological therapies for nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(13):3777-3785.
 126. Lavine JE. Effect of Vitamin E or Metformin for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents. *Jama*. 2011;305(16):1659.
 127. Wen B, Lampe JN, Roberts AG, Atkins WM, Rodrigues AD, Nelson SD. NIH Public Access. *October*. 2007;454(1):42-54.
 128. Gastaldelli A, Harrison S, Belfort-Aguiar R, et al. Pioglitazone in the treatment of NASH: The role of adiponectin. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32(6):769-775.
 129. Lewis JD, Ferrara A, Peng T, et al. Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: Interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*. 2011;34(4):916-922.
 130. Ratziu V, Giral P, Jacqueminet S, et al. Rosiglitazone for Nonalcoholic Steatohepatitis: One-Year Results of the Randomized Placebo-Controlled Fatty Liver Improvement With Rosiglitazone Therapy (FLIRT) Trial. *Gastroenterology*. 2017;135(1):100-110.
 131. Ratziu V, Charlotte F, Bernhardt C, et al. Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: Results of the Fatty Liver Improvement by Rosiglitazone Therapy (FLIRT 2) extension trial. *Hepatology*. 2010;51(2):445-

- 453.
132. Torres DM, Jones FJ, Shaw JC, Williams CD, Ward JA, Harrison SA. Rosiglitazone versus rosiglitazone and metformin versus rosiglitazone and losartan in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis in humans: A 12-month randomized, prospective, open-label trial. *Hepatology*. 2011;54(5):1631-1639.
 133. Arab JP, Candia R, Zapata R, et al. Management of nonalcoholic fatty liver disease: An evidence-based clinical practice review. *World J Gastroenterol*. 2014;20(34):12182-12201.
 134. Takeshita Y, Takamura T, Honda M, et al. The effects of ezetimibe on non-alcoholic fatty liver disease and glucose metabolism: A randomised controlled trial. *Diabetologia*. 2014;57(5):878-890.
 135. Loomba R, Sirlin CB, Ang B, et al. Ezetimibe for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: Assessment by novel magnetic resonance imaging and magnetic resonance elastography in a randomized trial (MOZART trial). *Hepatology*. 2015;61(4):1239-1250.
 136. Hirata T, Tomita K, Kawai T, et al. Effect of telmisartan or losartan for treatment of nonalcoholic fatty liver disease: Fatty liver protection trial by telmisartan or losartan study (FANTASY). *Int J Endocrinol*. 2013;2013.
 137. Pereira RM, Dos Santos RAS, Dias FLDC, Teixeira MM, Simões e Silva AC. Renin-angiotensin system in the pathogenesis of liver fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2009;15(21):2579-2586.
 138. Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley K V., et al. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1675-1685.
 139. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, et al. Effect of Vitamin E or Metformin for Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: The TONIC Randomized Controlled Trial. *JAMA J Am Med Assoc*. 2011;305(16):1659-1668.
 140. Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(11):2485-2490.

141. Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, et al. Ursodeoxycholic Acid or Clofibrate in the Treatment of Non – Alcohol-Induced Steatohepatitis : A Pilot Study. *Hepatology*. 1996;1464-1467.
142. Ratzu V, de Ledinghen V, Oberti F, et al. A randomized controlled trial of high-dose ursodesoxycholic acid for nonalcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2017;54(5):1011-1019.
143. Leuschner UFH, Lindenthal B, Herrmann G, et al. High-dose ursodeoxycholic acid therapy for nonalcoholic steatohepatitis: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hepatology*. 2010;52(2):472-479.
144. Louis S, Loomba R, Jolla L, Natta ML Van, Abdelmalek MF, Dasarathy S. HHS Public Access. 2016;385(9972):956-965.
145. Han Y, Shi J-P, Ma A-L, Xu Y, Ding X-D, Fan J-G. Randomized, Vitamin E-Controlled Trial of Bicyclol Plus Metformin in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients with Impaired Fasting Glucose. *Clin Drug Investig*. 2014;34(1):1-7.
146. Han Y-P, Kong M, Zheng S, et al. Vitamin D in liver diseases: from mechanisms to clinical trials. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 1(S1):49-55.
147. Targher G, Bertolini L, Scala L, et al. Associations between serum 25-hydroxyvitamin D₃ concentrations and liver histology in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017;17(7):517-524.
148. Masterton GS, Plevris JN, Hayes PC. Review article: Omega-3 fatty acids - A promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31(7):679-692.
149. Mathurin P, Hollebecque A, Arnalsteen L, et al. Prospective Study of the Long-Term Effects of Bariatric Surgery on Liver Injury in Patients Without Advanced Disease. *Gastroenterology*. 2009;137(2):532-540.
150. Nc C, Fi T, Cervera J, et al. Bariatric surgery for non-alcoholic steatohepatitis in obese patients (Review). *Cochrane Libr*. 2010;(3):3-5.
151. Mummadi RR, Kasturi KS, Chennareddygar S, Sood GK. Effect of Bariatric Surgery on Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Systematic Review and Meta-

- Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(12):1396-1402.
152. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. A randomized trial of iron depletion in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia. *World J Gastroenterol*. 2014;20(11):3002-3010.
153. Adams LA, Crawford DH, Stuart K, et al. The impact of phlebotomy in nonalcoholic fatty liver disease: A prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology*. 2015;61(5):1555-1564.
154. Liu T, Borjigin J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. *J Pineal Res*. 2005;39(1):91-96.
155. Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;19(1):17-24.
156. Tan DX, Manchester LC, Liu X, Rosales-Corral SA, Acuna-Castroviejo D, Reiter RJ. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *J Pineal Res*. 2013;54(2):127-138.
157. Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero E, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and metabolism. *Molecules*. 2015;20(10):18886-18906.
158. Tan DX, Zheng X, Kong J, et al. Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):15858-15890.
159. Review article application. 1999.
160. Pandi-Perumal SR, Smits M, Spence W, et al. Dim light melatonin onset (DLMO): A tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2007;31(1):1-11.
161. Karasek M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol*. 2004;39(11-12):1723-1729.

162. Castro MR, Pastor AB, Alcantud JF, Salván JH, Osado IR. Alteración de los niveles plasmáticos de melatonina tras la administración de propofol en perfusión continua. *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 2007;469:469-474.
163. Lewy AJ, Sack RL. Exogenous Melatonin's Phase-Shifting Effects on the Endogenous Melatonin Profile in Sighted Humans: A Brief Review and Critique of the Literature. *J Biol Rhythms.* 1997;12(6):588-594.
164. Herxheimer A, Petrie KJ. Melatonin for the prevention and treatment of jet lag (Review) Melatonin for the prevention and treatment of jet lag. *Cochrane Collab.* 2009;(3):3-5.
165. Costello RB, Lentino C V, Boyd CC, et al. The effectiveness of melatonin for promoting healthy sleep: a rapid evidence assessment of the literature. *Nutr J.* 2014;13:106.
166. Rahal A, Kumar A, Singh V, et al. Oxidative Stress , Prooxidants , and Antioxidants : The Interplay. *Hindawi Publishing Corporation* 2014.
167. Reiter RJ, Tan D, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci.* 2000;7(6):444-458.
168. Tres A, Escudero P, Garc FA, Tan D, Reiter RJ, Ram JM. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes : a review. *J Pineal Res.* 2014:225-237.
169. Allegra M, Tan D. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res.* 2015;(October).
170. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Herrera F, Antolı I. Regulation of antioxidant enzymes : a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004:1-9.
171. Escames G, Leo J. bioenergetics. 2001:65-74.
172. Leo J. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res.* 2005; 38:1-9.
173. Singer SJ, Nicolson GL. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science (80-).* 1972;175(4023):720 LP-731.
174. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue

- Damage. *Clin Chem*. 1995;41(12):1819-1828.
175. Chen JJ, Yu BP. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med*. 1994;17(5):411-418.
176. García JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS, Mun A. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS lett*. 1997;408:297-300.
177. Dufourc E. Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine-based membranes Influence of melatonin on the order of phosphatidylcholine-based membranes. *J Pineal Res*. 2010;(September).
178. Esteban-zubero E, Alatorre-jiménez MA, López-pingarrón L, et al. Melatonin ' s role in preventing toxin-related and sepsis-mediated hepatic damage : A review. *Pharmacol Res*. 2016;105:108-120.
179. Ogeturk M, Kus I, Kavakli A, Zararsiz I, Ilhan N, Sarsilmaz M. Effects of melatonin on carbon tetrachloride-induced changes in rat serum. *J Physiol Biochem*. 2004;60(3):205.
180. Aranda M, Albendea CD, Lostalé F, López-Pingarrón L, Fuentes-Broto L, Martínez Ballarín E, Reiter RJ, Pérez-Castejón MC, García JJ. In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity : protection by melatonin and pinoline. *J Pineal Res*. 2010;(I):78-85.
181. Noyan T, Kömüroğlu U, Bayram İ, Şekeroğlu MR. Comparison of the effects of melatonin and pentoxifylline on carbon tetrachloride-induced liver toxicity in mice. *Cell Biol Toxicol*. 2006;22(6):381-391. 182.
183. Özen H, Karaman M, Çiğremiş Y, Tuzcu M, Özcan K, Erdağ D. Effectiveness of melatonin on aflatoxicosis in chicks. *Res Vet Sci*. 2009;86(3):485-489.
184. Mercan S, Eren B. Protective role of melatonin supplementation against nicotine-induced liver damage in mouse. *Toxicol Ind Health*. 2012;29(10):888-896.
185. Czechowska G, Celinski K, Korolczuk A, et al. Protective effects of Melatonin Against Thioacetamide-induced Liver Fibrosis in Rats. *J Physiol Pharmacol*. 2015;(6):567-579.

186. Öz E, İlhan MN. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. *Mol Cell Biochem.* 2006;286(1):11-15.
187. Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA, Arafa M. Melatonin controls oxidative stress and modulates iron, ferritin, and transferrin levels in adriamycin treated rats. *Life Sci.* 2008;83(15–16):563-568.
188. Crespo E, Macías M, Pozo D, et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 1999;13(12):1537-1546.
189. Şener G, Toklu H, Kapucu C, et al. Melatonin Protects Against Oxidative Organ Injury in a Rat Model of Sepsis. *Surg Today.* 2005;35(1):52-59.
190. Wu J-Y, Tsou M-Y, Chen T-H, Chen S-J, Tsao C-M, Wu C-C. Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res.* 2008;45(1):106-116.
191. Peralta C, Jiménez-castro MB, Gracia-sancho J. Review Hepatic ischemia and reperfusion injury: Effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 2013;59(5):1094-1106.
192. Casillas-ramírez A, Mosbah I Ben, Ramalho F, Roselló-catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci.* 2006;79:1881-1894.
193. Mathie RT, Sc B, Ph D. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The american Journal of Surgery.* 2001;181:160-166.
194. Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS. Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology.* 1992;16(5):1236-1240. doi:10.1002/hep.1840160521.
195. Orie YOH, Olf ROW, Ussell JAR, Hanley THPS, Ranger DNEILG. Role of Kupffer Cells in Gut Ischemia / Reperfusion-Induced Hepatic Microvascular Dysfunction in Mice. *Hepatology.* 1997;26(6):1499-505
196. Rauen U, Elling B, Gizewski ER, Korth H-G, Sustmann R, de Groot H. Involvement of Reactive Oxygen Species in the Preservation Injury to Cultured

- Liver Endothelial Cells. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(1–2):17-24.
197. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J*. 1990;4(15):3355-3359..
 198. Li Y, Yang Y, Feng Y, et al. REVIEW ARTICLE A review of melatonin in hepatic ischemia / reperfusion injury and clinical liver disease. *Ann Med* 2014;1(June):503-511. doi:10.3109/07853890.2014.934275.
 199. Sener G, Tosun O, şehirli AÖ, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci*. 2003;72(24):2707-2718.
 200. Kang J, Koh E, Lee S. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. 2011:403-411.
 201. Rodriguez-Reynoso S, Leal C, Portilla E, Olivares N, Muñoz J. Effect of Exogenous Melatonin on Hepatic Energetic Status during Ischemia/Reperfusion: Possible Role of Tumor Necrosis Factor- α ; and Nitric Oxide. *J Surg Res*. 2017;100(2):141-149.
 202. Liang R, Nickkholgh A, Hoffmann K, et al. Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. *J Pineal Res*. 2009;46(1):8-14.
 203. Reiter RJ. Author copy only. 2016;(September 2015).
 204. Rosello- J. Melatonin protects steatotic and nonsteatotic liver grafts against cold ischemia and reperfusion injury. *J Pineal Res*. 2011:213-221.
 205. Okatani Y, Wakatsuki A, Reiter RJ, Enzan H, Miyahara Y. Protective effect of melatonin against mitochondrial injury induced by ischemia and reperfusion of rat liver. *Eur J Pharmacol*. 2003;469:145-152.
 206. Esteban-Zubero E, García-Gil FA, López-Pingarrón L, et al. Melatonin role preventing steatohepatitis and improving liver transplantation results. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(15):2911-2927.
 207. Hu S, Yin S, Jiang X, Huang D, Shen G. Melatonin protects against alcoholic

- liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2009;616(1–3):287-292.
208. Mishra A, Paul S, Swarnakar S. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 by melatonin during prevention of alcohol-induced liver injury in mice. *Biochimie.* 2011;93(5):854-866.
209. Mansouri A, Demeilliers C, Amsellem S, Pessayre D, National I, Sante D. Acute Ethanol Administration Oxidatively Damages and Depletes Mitochondrial DNA in Mouse Liver , Brain , Heart , and Skeletal Muscles : Protective Effects of Antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;298(2):737-743.
210. Kurcer Z, Oğuz E, Iraz M, et al. Melatonin improves methanol intoxication-induced oxidative liver injury in rats. *J Pineal Res.* 2007;43(1):42-49. doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00441.x.
211. Sun H, Huang F, Qu S. Melatonin : a potential intervention for hepatic steatosis. *Lipids Health Dis.* 2015:1-6.
212. Pan M, Song YL, Xu J. Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. *J Pineal Res.* 2006;(i):79-84.
213. Hatzis G, Ziakas P, Kavantzias N, et al. Melatonin attenuates high fat diet-induced fatty liver disease in rats. *World J Hepatol.* 2013;5(4):160-169.
214. Hoyos M, Jm G, Olivan J, et al. Serum cholesterol and lipid peroxidation are decreased by melatonin in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Pineal Res.* 2000:150-155.
215. Chen X, Zhang C, Zhao M, Shi CE, Zhu RM, Zhao H, Wei W, Li JB, Xu DX. Res P. Melatonin alleviates lipopolysaccharide-induced hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in mice. *J Pineal Res.* 2011:416-425.
216. Tahan V, Atug O, Akin H, Eren F, Tahan G, Tarcin O, Uzun H, Ozdogan O. Melatonin ameliorates methionine- and choline-deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. *J Pineal Res.* 2009:401-407.
217. Agil A, EI-Hammadi M, Jiménez-Aranda A, Tassi M, Abdo W, Fernández-Vázquez G, Reiter RJ. Melatonin reduces hepatic mitochondrial dysfunction in diabetic obese rats. *J Pineal Res.* 2015:70-79.

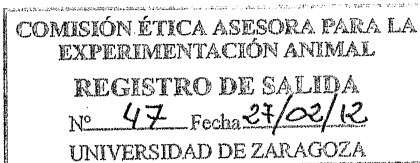
218. Subramanian P, Mirunalini S, Pandi-perumal SR. Melatonin treatment improves the antioxidant status and decreases lipid content in brain and liver of rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;571:116-119.
219. Atilgan D, Parlaktas BS, Uluocak N, et al. Weight Loss and Melatonin Reduce Obesity-Induced Oxidative Damage in Rat Testis. *Adv Urol.* 2013;2013.
220. Cichoz-Lach H, Celinski K, Konturek PC, Konturek SJ, Slomka M, Clinic T. The Effectos of L-Tryptophan and Melatonin on Selected Biochemical parameters in pacients with Steatohepatitis. *J Physiol Pharmacol.* 2010;(7):577-580.
221. Gonciarz M, Gonciarz Z, Bielanski W, et al. The Pilot Study of 3-Month course of Melatonin Treatment of Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis: Effect on Plasma Levels of Liver Enzymes Lipids and Melatonin. *J Physiol Pharmacol.* 2010;(9):705-710.
222. Gonciarz M, Gonciarz Z, Bielanski W, et al. The effects of long-term melatonin treatment of plasma liver enzymes levels and plasma concentrations of lipids and melatonin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *J Physiol Pharmacol.* 2012:35-40.
223. Celinski K, Konturek PC, Slomka M, Brzozowski T, Konturek SJ, Korolczuk A. Effects of treatment with melatonin and tryptophan on liver enzymes, parametrs of fat metabolism and plasma levels of cytokines in patients with non-alcoholic fatty liver disease-14 months follow-up. *J Physiol Pharmacol.* 2014;(13):75-82.
224. Gonciarz M, Bielsanski W, Partyka R, Brzozowski T, Konturek PC, Eszyk J, Celinski K, Reiter RJ, Konturek SJ. Plasma insulin, leptin, adiponectin, resistin, ghrelin, and melatonin in nonalcoholic steatohepatitis patients treated with melatonin. *J Pineal Res.* 2013:154-161.
225. Nobili V, Manco M, Devito R, Di Ciommo V, Comparcola D et al. Lifestyle Intervention and Antioxidant Therapy in Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized, Controlled Trial. *Hepatology.* 2008 Jul;48(1):119-28.
226. Koca SS, Bahcecioglu IH, Poyrazoglu OK, Ozercan IH, Sahin K, Ustundag B. The Treatment with Antibody of TNF- α Reduces the Inflammation, Necrosis and Fibrosis in the Non-alcoholic Steatohepatitis Induced by Methionine- and

- Choline-deficient Diet. *Inflammation*. 2008;31(2):91-98.
227. Mets B, Kamban JAYR, Janicki PK, Franks J, Neveling U, Hickman R. Alcohol pretreatment does not affect bupivacaine pharmacokinetics in the pig. *Pharmacol Res*. 1996;33(4):291-295.
228. Spannbaauer MM, Oleszczuk A, Tannapfel A, et al. Micro- and macrovesicular steatotic liver model for transplantation induced by ethanol and protein-deficient diet. *Transplant Proc*. 2017;37(1):210-211.
229. Lee L, Alloosh M, Saxena R, et al. Nutritional Model of Steatohepatitis and Metabolic Syndrome in the Ossabaw Miniature Swine. 2009:56-67.
230. Liang T, Alloosh M, Bell LN, Fullenkamp A, Saxena R. Liver Injury and Fibrosis Induced by Dietary Challenge in the Ossabaw Miniature Swine. *PLoS One*. 2015;(c):1-14.
231. Gonzalo MA, Martínez-Beamonte R, Palacios P, et al. Analysis of Tissue Bioimpedance as a Measurement of Liver Steatosis: Experimental Model in Large Animals. *Transplant Proc*. 2017;44(6):1579-1583. doi:10.1016/j.transproceed.2012.05.006.
232. Vaughan GM, Allen JP, Vaughan MK, Siler-Khodr TM. Influence of pinealectomy on corticotropin (ACTH). *Experientia*. 1980;36(3):364-366.
233. Aoyama H, Mori N, Mori W. Effects of melatonin on genetic hypercholesterolemia in rats. *Atherosclerosis*. 2017;69(2):269-272.
234. Mori N, Aoyama H, Murase T, Mori W. Anti-hypercholesterolemic Effect of Melatonin in Rats. *Pathol Int*. 1989;39(10):613-618.
235. Ueno T, Sugawara H, Sujaku K, et al. Therapeutic effects of restricted diet and exercise in obese patients with fatty liver. *J Hepatol*. 2017;27(1):103-107.
236. Suzuki A, Lindor K, Saver JS, et al. Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2005;43(6):1060-1066.
237. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J*. 2006;273(13):2813-2838.

238. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res.* 2007;42(1):28-42.



comisión ética asesora
para la experimentación animal
Universidad de Zaragoza



Ref. PI02/12

CONTROL DE BUENA PRÁCTICA EN EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Título procedimiento de experimentación:

Efecto de la melatonina como fármaco antioxidante para revertir la esteatosis hepática. Modelo experimental

Título del proyecto en el que se incluye:

Efecto de la melatonina como fármaco antioxidante para revertir la esteatosis hepática. Modelo experimental

Investigador responsable en la U.Z.: Antonio Güemes Sánchez

Duración: 1 año

Fecha estimada de inicio del procedimiento: Marzo, 2012

Animales que implica:

especie (s): Porcina

peculiaridades: Large-White x Landrace

número: 28

Fecha de presentación: 18 de enero de 2012

Reunida la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal el día 16 de febrero de 2012, y una vez revisada la documentación disponible en relación al procedimiento de experimentación descrito, considera:

QUE EL PROCEDIMIENTO CUMPLE LOS PRINCIPIOS ÉTICOS Y DE PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS PARA EXPERIMENTACIÓN QUE SE HA IMPUESTO LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, Y SE ADAPTA A LA NORMATIVA VIGENTE (R.D. 1201/2005). Por todo ello, se emite **informe FAVORABLE**.

Esta evaluación será válida únicamente para ESTE PROCEDIMIENTO y durante un periodo de tiempo de tres años, salvo modificación sustancial del procedimiento presentado. La realización del procedimiento queda supeditada igualmente a la disponibilidad de las instalaciones necesarias en el momento en que se plantee la realización del mismo.

En Zaragoza, a 22 de febrero de 2012

EL SECRETARIO DE LA COMISIÓN

Jorge Palacio Liesa



Comisión ética
asesora para la
experimentación animal
Universidad Zaragoza

LA PRESIDENTA DE LA COMISIÓN

Blanca Ros Latienda

C/. Domingo Miral, s/n - 50009 Zaragoza · Teléfono (+34) 976 76 28 47 · Fax: (+34) 976 76 12 36

cea@unizar.es <http://cea.unizar.es>